

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :  C12N 1/08, 15/10	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/11221 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Juni 1993 (10.06.93)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02775</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 1. Dezember 1992 (01.12.92)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 41 39 664.2 2. Dezember 1991 (02.12.91) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DIA- GEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Straße 4, D-4010 Hilden (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : COLPAN, Metin [DE/ DE]; Uhlandstr. 5, D-4300 Essen (DE).</p> <p>(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw. ; Deichmannhaus am Hauptbahnhof, D-5000 Köln 1 (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>	

(54) Title: DEVICE AND PROCESS FOR ISOLATING AND PURIFYING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON NUKLEINSÄU-  
REN

## (57) Abstract

The description relates to a process for isolating and purifying nucleic acids like plasmide or genomic DNA from cells or other sources in which: a) the cells containing nucleic acid are disintegrated and the cell fragments removed or other nucleic acid-containing samples are treated with anion exchangers in buffer solutions of low ionic strength; b) the nucleic acids are then desorbed from the anion exchanger using a buffer of higher ionic strength in order then c) to be treated in the higher ionic-strength buffer or in the presence of lower alcohols and/or polyethylene glycol with a mineral base material with the adsorption of the nucleic acid on the surface of the mineral base, whereupon d) the nucleic acid is desorbed with water or a lower ionic-strength buffer solution. The device for implementing the process of the invention consists of a hollow body (1) with an inlet aperture (7) and an outlet aperture (8), in which a powdered first silica-gel-based material (10) is inserted into the hollow body (1) between two securing devices (5 and 6) and a second material (11) is arranged between the first material (10) and the outlet aperture, whereby the first and second materials (10, 11) have different adsorption characteristics for nucleic acids.

## (57) Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren beschrieben zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren wie Plasmid- oder genomischer DNA aus Zellen oder anderen Quellen, wobei a) die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer entfernt werden oder sonstige nukleinsäurehaltige Proben mit Anionenaustauschern behandelt werden, und zwar in Pufferlösungen mit geringer Ionenstärke, b) danach die Nukleinsäuren mit einem Puffer hoher Ionenstärke von dem Anionenaustauscher desorbiert werden, um danach c) im Puffer hoher Ionenstärke oder in Gegenwart von niederen Alkoholen, und/oder Polyethylenglykol mit einem mineralischen Trägermaterial behandelt zu werden unter Adsorption der Nukleinsäure an die Oberfläche der mineralischen Trägerstoffe, woraufhin d) eine Desorption der Nukleinsäure mit Wasser oder einer Pufferlösung mit geringer Ionenstärke erfolgt. Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht aus einem Hohlkörper (1) mit einer Einlaßöffnung (7) und einer Auslaßöffnung (8), wobei im Hohlkörper (1) zwischen zwei Fixiereinrichtungen (5 und 6) ein pulverförmiges erstes Material auf Silicagelbasis (10) angeordnet ist und ein zweites Material (11) zwischen dem ersten Material (10) und der Auslaßöffnung (8) angeordnet ist, wobei die ersten und zweiten Materialien (10, 11) unterschiedliche Adsorptionscharakteristika für Nukleinsäuren aufweisen.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanken
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NL	Niederlande
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PT	Portugal
BR	Brasilien	IE	Irland	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

"Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung  
und Reinigung von Nukleinsäuren"

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren wie Plasmid- oder genomischer DNA aus Zellen oder anderen Quellen und eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß Oberbegriff des Patentanspruchs 16.

Bei der Präparation von Nukleinsäuren müssen die Zellen zunächst durch die Verwendung von Enzymen, wie zum Beispiel Proteinase K, Lysozym und Detergentien wie SDS, Brij, Triton-X-100, Tween 20, DOC und Chemikalien wie Natriumhydroxid, Guanidin-Hydrochlorid und Guanidin-Isothiocyanat aufgeschlossen werden. Dem Experimentator stellt sich das Problem, vor der Reinigung der Nukleinsäuren die Zelltrümmer zu entfernen und dann aus dem Zell-Lysat die Nukleinsäuren oder Nukleinsäurefraktionen zu isolieren. Weiterhin müssen bei der Präparation von Plasmid DNA oder genomischer DNA häufig verwendete Detergentien, wie SDS (Sodiumdodecylsulfat), entfernt werden. Dies erfolgt wie in den meisten Fällen bei Verwendung von SDS durch ein Ausfällen mit Kalziumacetat, da das Kaliumsalz von SDS schwer löslich ist. Die Zelltrümmer werden dann zusammen mit dem ausgefallenen SDS abzentrifugiert. Da die Bestandteile im Lysat ein sehr voluminöses und schmieriges, gelartiges Pellet ergeben, bereitet selbst die Abtrennung dieser Trümmer in einer hochtourigen Zentrifuge Schwierigkeiten. Üblicherweise erfolgt die Entfernung der Zelltrümmer durch eine Zentrifugation zwischen 5.000 g bis 20.000 g für 15 bis 60 Minuten. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß es sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist und sich nicht automatisieren läßt.

Die DE-A 36 39 949 beschreibt ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung langkettiger Nukleinsäuren von anderen Substanzen aus Bakterien, Viren, tierischen und pflanzlichen Geweben und Zellen sowie Körperflüssigkeiten, insbesondere Zellinhaltsstoffen und/oder deren Abbauprodukten sowie Bestandteilen der Körperflüssigkeiten, die nicht langkettige Nukleinsäuren sind. Dabei werden die langkettigen Nukleinsäuren nach einem schonenden Aufschluß und Entfernung der Zellbruchstücke und anderer ungelöster Bestandteile an einem Anionenaustauscher fixiert, während die abzutrennenden Substanzen ausgewaschen werden. Danach werden die fixierten Nukleinsäuren mit einem Puffer hoher Ionenstärke von der Matrix wieder abgelöst.

Aus der DE-A 37 17 211 ist ein Verfahren bekannt zur Trennung und Reinigung von Biopolymeren, wie Nukleinsäuren, wobei die Nukleinsäuren an einer in einer speziellen Vorrichtung angeordneten Matrix adsorbiert werden. Die Pufferbedingungen sind dabei so eingestellt, daß die Nukleinsäuren überwiegend adsorbiert werden, während störende Substanzen, wie Proteine, niedermolekulare Stoffe oder auch Zelltrümmer, nicht gebunden werden.

In "Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung von Nukleinsäuren, eine Einführung und methodische Anleitung", herausgegeben von Ulrich Wobus, Verlag Chemie, 1980 werden Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren beschrieben. Daraus geht hervor, daß hochmolekulare Ribonukleinsäuren in Salzlösungen  $> 1,5$  M Natriumchlorid unlöslich sind und ausfallen. Diese Präzipitation wird jedoch als nicht effizient angesehen, so daß in dieser Monographie bereits mehrfache Wiederholungen der Präzipitationsschritte mit hoher Salzkonzentration empfohlen werden.

Eine effiziente Trennung sowohl von DNA-Restriktionsfragmenten und amplifizierten Produkten der Polymerase-Kettenreaktion wird in J. Chromatogr., 1990, 512, 433 - 444 beschrieben. Als Chromatographiematerial wird ein Ionenaustauscher DEAD-NPR-Material mit 2,5  $\mu\text{m}$  großen, nicht porösen Partikeln verwendet.

Nukleinsäure aus Hefen wurden gemäß Biochemistry 1972, 4848 an Poly(L-Lysine)-beschichtetem Kieselguhr getrennt. Ebenso wurde bereits mitochondriale DNA an solchen chromatographischen Materialien getrennt.

In Chromatographia, 1984, 19, 236 - 9 wird die Verwendung von mehrdimensionaler Chromatographie zur Isolierung von synthetischen Oligodeoxyribonukleotiden im präparativen Maßstab beschrieben. In einem ersten Schritt wird dabei zunächst eine Size-Exclusion-Chromatographie an Sephadex G-15 durchgeführt, gefolgt von einer Size-Exclusion-Chromatographie mit einer HPLC-Ionenaustauschersäule (Partisil-10 SAX). Daran schließt sich eine hydrophobe Chromatographie mittels HPLC (Nucleosil C18) an.

Über die Eignung von hydrophob beschichteten Glaspartikeln zur Durchführung von adsorptions-chromatographischer Reinigung von Nukleinsäuren wird in J. Biochem. 94, 163 - 169 (1983) berichtet.

Nachteilig an diesem stellvertretenden Stand der Technik ist die Tatsache, daß ein Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Zellbruchstücke und der ungelösten Bestandteile aus dem Zell-Lysat notwendig ist. Ein weiteres Problem besteht darin, daß die Nukleinsäuren durch die Elution in Puffern hoher Ionenstärke von den in großer Konzentration vorhandenen Salzen befreit und gleichzeitig konzentriert werden müssen. In den allermeisten Fällen

sind die weiteren Verfahrensoperationen mit den so gewonnenen Nukleinsäuren nur mit Pufferbedingungen möglich, die geringere Ionenstärken aufweisen. Die Entfernung der in hoher Konzentration im Puffer gelösten Salze kann auch durch Dialyse erfolgen, jedoch führt dies zu merklicher Degradation der Nukleinsäuren in den entsprechenden Proben. Nach der Dialyse muß die entsalzte Nukleinsäure durch eine Gefriertrocknung konzentriert werden. Eine andere Art der Konzentrierung erfolgt durch eine Fällung der Nukleinsäure mit Ethanol, Isopropanol, Polyethylenglykol (PEG). Die Nukleinsäuren sind in diesem System nicht löslich und fallen aus. Die ausgefallenen Nukleinsäuren müssen jedoch durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert werden. Das Nukleinsäurepellet wird kurz getrocknet und anschließend in einem kleinen Volumenpuffer sehr niedriger Salzkonzentrationen gelöst, um eine konzentrierte salzfreie Nukleinsäureprobe zu erhalten. Durch diese Zentrifugations- und Fällungsverfahren ist eine einfache und schnelle Gewinnung von Nukleinsäuren nicht möglich und eine Automatisierung läßt sich nur schwer durchführen. Andererseits steigt der Bedarf nach einfachen und automatischen Verfahren zur Präparation von Nukleinsäuren durch das Vordringen der Molekularbiologie in die klinische Diagnostik sowie die Sequenzierung des menschlichen Genoms. Dabei sind jeweils große Probenmengen aufzuarbeiten.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, daß es ermöglicht, Nukleinsäuren zu isolieren und zu reinigen, ohne daß ein Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Zellbruchstücke oder ungelöster Bestandteile des Zelllysats notwendig wäre und, ohne daß die Nukleinsäuren in Puffersystemen hoher Salzkonzentrationen anfallen, wobei die Nukleinsäuren einen nachgeschalteten Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt notwendig machen. Das bereitzu-

stellende Verfahren soll die Nukleinsäuren praktisch in einem direkt weiterverarbeitbaren Zustand liefern. Ein weiterer Aspekt des genannten technischen Problems besteht in der Schaffung einer Vorrichtung, mit der das Verfahren in besonders vorteilhafter Weise ausgeführt werden kann.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird in überraschend einfacher Weise durch ein Verfahren gelöst, daß durch die Merkmale des Anspruchs 1, 34, 36 charakterisiert ist. Die daran anschließenden Verfahrensansprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Eine Vorrichtung, mit der das erfindungsgemäße Verfahren in besonders vorteilhafter Weise ausgeführt werden kann, ist durch die Merkmale des Anspruchs 16, 35, 37 charakterisiert. Die darauf zurückbezogenen Unteransprüche betreffen weitere bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

Zunächst werden die Zellen, deren Nukleinsäure isoliert werden sollen, in üblicher Weise aufgeschlossen und die Zelltrümmer werden entfernt. Dies kann mittels Filtration oder Zentrifugation geschehen. Vorzugsweise erfolgt die Gewinnung der klaren Zell-Lysate durch eine Filtration über eine stufenweise oder asymmetrisch aufgebaute Filterschicht. Das die Nukleinsäuren enthaltende Filtrat kann sofort mit Anionenaustauschern behandelt werden. Als Anionenaustauscher kann ein handelsübliches Material ausgewählt werden, welches eine Bindung der zu isolierenden Nukleinsäure unter den jeweiligen Präparationsbedingungen erlaubt. Die Anionenaustauscher sind vorzugsweise oberflächenmodifizierte Träger aus einer Matrix, vorzugsweise bestehend aus Agarose, Dextran, Zellulose, Acrylamid, Polyvinylalkohol, Polystyrol, Glas, Aluminiumoxid, Titan-

dioxid, Zirkondioxid oder Silicagel, wie zum Beispiel DEAE-Sepharose<sup>R</sup>, Q-Sepharose<sup>R</sup>, DEAE-Sephadex<sup>R</sup>, DEAE-Toyopearl<sup>R</sup>, Amberlite<sup>R</sup>, Nukleogen<sup>R</sup>, Qiagen<sup>R</sup>. Die Anionenaustauscher können poröse Trägermaterialien mit einer zur Wechselwirkung geeigneten inneren Oberfläche hoher Kapazität oder nicht poröse Trägermaterialien sein, die nur auf der äußeren Oberfläche eine Wechselwirkung mit dem zu trennenden Gemisch eingeht. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Anionenaustauscher um ein Material auf Basis von Silicagel, das eine Partikelgröße von 1 bis 250 µm, vorzugsweise 10 bis 50 µm und ganz besonders bevorzugt 15 bis 25 µm und einen Porendurchmesser von 1 bis 2.500 nm, bevorzugt 10 bis 500 nm, besonders bevorzugt 100 bis 400 nm, aufweist. Als Anionenaustauschermaterial hat sich insbesondere ein Material mit hoher Oberflächenladung und hoher Bindungskapazität für Nukleinsäuren erwiesen. Die Modifizierung des Silicagels erfolgt vorzugsweise durch Silanisierung des Trägermaterials, wie beispielsweise in der EP-A 83 901 065, DE-A-39 35 098 und US-A-5,057,426 offenbart. In der EP-A 83 901 065 wird zum Beispiel gamma-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und N,N-Dimethylaminoethanol zur Modifizierung des Trägermaterials verwendet.

Die Adsorption der Nukleinsäuren erfolgt unter Bedingungen, wie sie typischerweise bei niedrigen Salzkonzentrationen vorliegen. Vorzugsweise sind dies niedrigere Salzkonzentrationen als solche mit der die Nukleinsäuren von der Säule eluiert werden können. Je nach verwendeten Ionenaustauschermaterialien und pH-Werten kann die Salzkonzentration dabei 0,25 bis 1,5 M betragen.

Nach der Adsorption der Nukleinsäuren an dem Anionenaustauschermaterial kann sich mindestens ein Waschschriff mit Puffer geringer Ionenstärke anschließen.



Vorzugsweise befindet sich das Ionenaustauschermaterial dabei in einem überwiegend zylindrischen Hohlkörper einer Säule. Die Säule wird dann mit einer Salzlösung gewaschen, deren Ionenstärke so hoch wie möglich ist, ohne daß die erwünschte Nukleinsäure eluiert wird. Damit werden niedermolekulare und schwach geladene Verunreinigungen und Proteine ausgewaschen.

Um unnötige Ausbeuteverluste zu vermeiden, kann es vorteilhaft sein, zwischen dem Adsorptionsschritt und dem Ellutionsschritt oder als letzten Waschschrift eine Konditionierung der betreffenden Adsorptionsmaterialien durchzuführen, indem eine möglichst hohe Ionenstärke insbesondere in dem Bereich, in dem die spätere Adsorption der Nukleinsäure unter Hochsalzbedingungen erfolgen soll, durchgeführt wird. Dazu kann insbesondere eine Lösung zur Äquilibrierung und Konditionierung verwendet werden, die einer Ionenstärke von etwa 1,5 M Natriumperchlorat bei einem pH von ungefähr 5 entspricht.

Entsprechend befindet sich das Material zur Bindung der Nukleinsäuren unter Bedingungen hoher Ionenstärke in einem separaten überwiegend zylindrischen Hohlkörper. Die von dem Ionenaustauschermaterial desorbierte Nukleinsäurefraktion wird in der hoch salzhaltigen Fraktion in die Kartusche oder die Säule mit dem Nukleinsäuren unter Hochsalzbedingungen absorbierenden Material gegeben. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die jeweiligen Vorrichtung mit den entsprechenden Adsorptionsmaterialien so aufeinander abgestimmt, daß der Behälter mit dem Anionenaustauscher auf den Behälter mit dem Nukleinsäure unter hohen Ionenstärken bindenden Material enthaltenden Behälter angeordnet werden kann.

Eine Konditionierung des Materials, das die Nukleinsäuren bei hoher Ionenstärke adsorbieren kann, ist insbesondere

bei dieser Vorgehensweise besonders leicht möglich. Die Konditionierung kann bereits dadurch erfolgen, daß das Material, das die Nukleinsäuren bei hoher Ionenstärke binden kann, mit entsprechend hochkonzentrierten Salzlösungen vorbehandelt wird. Es ist jedoch auch möglich, entsprechend vorbehandelte Materialien zu verwenden, indem beispielsweise das Nukleinsäure absorbierende Material zunächst mit Salzlösungen hoher Ionenstärke behandelt wird und danach das Lösungsmittel verdampft wird, so daß sich in den Nukleinsäuren unter hohen Ionenstärken absorbierende Material sehr hohe Salzkonzentrationen unmittelbar einstellen, wenn eine wäßrige Lösung damit in Verbindung gebracht wird. Vorteilhaft ist die Konditionierung aufgrund der Tatsache, daß die ersten Volumeneinheiten, die sich durch die Elution der Nukleinsäuren vom Anionenaustauscher von diesem Material lösen noch eine möglicherweise zu geringe Salzkonzentration aufweisen, um hinreichend fest an dem folgenden Material zu adsorbieren. Trifft nun ein relativ verdünnter Elutionstropfen vom Anionenaustauscher auf ein so konditioniertes Material, das Nukleinsäure unter Bedingungen hoher Ionenstärke zu binden vermag, so stellt sich sofort eine hohe Salzkonzentration ein und die Nukleinsäuren werden an diesem Material adsorbiert.

Danach kann die Nukleinsäure mit einem Puffer hoher Ionenstärke von dem Anionenaustauschermaterial desorbiert, um dann unmittelbar im Elutionspuffer hoher Ionenstärke mit einem mineralischen Träger gebunden zu werden. Nukleinsäuren können in Gegenwart von chaotropen Salzen wie Natriumiodid, Natriumperchlorat an feingemahlenem Glas oder Silicagel gebunden werden, wenn man die Nukleinsäuren mit der feinen Glas- bzw. Silicagel-suspension versetzt und längere Zeit inkubiert, um eine Bindung der Nukleinsäure an das Silicagel zu ermöglichen (B. Vogelstein und D. Gillespie, 1979, Proc. Nat. Aca.

Sci USA, 76, 615 - 19; Preparative and analytical purification of DNA from agarose; R. Yang, J. Lis und B. Wu, 1979, Elution of DNA from agarose after gel electrophoresis, Methods Enzymol. 65, 176 - 182; M.A. Marko, R. Chipperfield und H.C. Birnboim, 1982, A procedure for the large scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder, Anal. Biochem, 121, 382 - 387).

Die Adsorption der Nukleinsäuren an die mineralischen Träger kann überraschenderweise auch durch Zugabe von niederen Alkoholen in die Probe erfolgen. In Frage kommen vorzugsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol sowie Butanol. Die bevorzugten Mengenbereiche, in denen die Alkohole der Probe zugesetzt werden, betragen 1 - 50% (v/v), soweit sie überhaupt in diesen Bereichen in Wasser löslich sind. Desweiteren kann die Adsorption der Nukleinsäuren auch durch Polyethylenglykole erreicht werden. Die verwendbaren Ethylenglykole weisen Molekulargewichte von 1.000 bis 100.000, insbesondere 6.000 bis 8.000, auf. Polyethylenglykol kann in Bereichen von 1 - 30% der Probe zugesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeigt überraschenderweise, daß Nukleinsäure auch beim Passieren von sehr dünnen Schichten von Glas oder Silicagel effizient adsorbieren, obwohl die Verweilzeit nur 1 - 30 Sekunden beträgt. Es zeigt sich auch, daß eine Bindung in hohen Natriumchlorid- und Lithiumchloridkonzentrationen erfolgt und chaotrope Salze nicht notwendig sind. Auch ist bisher eine Kombination aus Anionenaustauscher und Silicagel nicht beschrieben, wobei der Anionenaustauscher die Reinigung der Nukleinsäure übernimmt und bei den Konzentrationen von 0,25 M - 1,5 M Salz zwar die Verunreinigungen, wie Metaboliten, Proteine und teilweise RNA, Polysaccharide entfernt werden, aber diese unter den gegebenen Bedingungen

nicht an die nachgeschaltete Silicagelschicht adsorbieren können, und die Silicagelschicht die Entsalzungs- und Konzentrationsaufgabe übernimmt, wenn die Nukleinsäure im folgenden Schritt mit einer Salzkonzentration vom Anionenaustauscher eluiert wird, die hoch genug ist die Nukleinsäure an die Silicagelschicht adsorbieren kann.

Als Puffersalze in den angegebenen Konzentrationen kommen für den Adsorptionsschritt an den mineralischen Träger folgende in Betracht:

Salz	Konzentration
NaCl:	3 - 5 M
NaClO <sub>4</sub> :	5 - 7 M
Gu-HCl:	5 - 7 M
NaJ:	3 - 5 M

Die Behandlung mit der Salzlösung kann einfach durch Auftropfen auf den Filter und Absaugen erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Silicagelschicht mit einer Perchloratlösung, pH 6,5 bis 8,5, insbesondere pH 7 bis 8, behandelt. Dies erfolgt zweckmäßig durch Pipettieren und Durchsaugen. Besonders bevorzugt wird hierzu eine Lösung, die 4 bis 8 M/l NaClO<sub>4</sub>, 5 bis 20 mM/l Tris-HCl, pH 7 bis 8 und 0,5 bis 2 mM/l EDTA enthält, verwendet. Nach dem Entfernen der chaotropen Lösungen, insbesondere der Natriumperchloratlösung, wird vorzugsweise mit wäbrigem Ethanol nachgewaschen, zum Beispiel mit 50 bis 90%-igem Ethanol.

Nach dem Trocknen der Filter erfolgt dann die Elution in üblicher Weise mit einer verdünnten wäbrigen Salzlösung, wie z. B. in Anal. Biochem. 101, 339 - 341 (1980) beschrieben. Ein bevorzugtes Elutionsmittel ist 0,5 bis 2 mM/l Tris-HCl, pH 7 bis 8, enthaltend 0,05 bis 0,2 mM/l

EDTA, im folgenden als TE bezeichnet. Besonders bevorzugt wird ein pH-Wert von 7,5 bis 8,5. Ein anderes geeignetes Elutionsmittel sind verdünnte Detergenslösungen, wie zum Beispiel 0,1% SDS, die jedoch weniger bevorzugt werden.

Es hat sich gezeigt, daß außer Silicagel auch andere mineralische Träger zur Adsorption der Nukleinsäure geeignet sind. In einer bevorzugten Form wird jedoch Silicagel der Partikelgröße 1 bis 250  $\mu\text{m}$ , bevorzugt 1 bis 50  $\mu\text{m}$ , insbesondere 1 - 5  $\mu\text{m}$ , eingesetzt. Die Entsalzungsschicht kann als eine lose geschüttete Schicht, die zwischen zwei PE-Fritten eingeschlossen ist, in der Extraktionssäule eingesetzt werden. Eine andere Ausführungsform beinhaltet die Anwendung der mineralischen Träger in Membranform nach EP 0 323 055 (07.12.1988, 3M, Composition Chromatographic Article).

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Nukleinsäuren verschiedenster Provenienz getrennt und präpariert werden. Dabei ist es gleichgültig, ob die Nukleinsäuren aus Bakterien, Zellkulturen, Blut, Gewebe, Urin, Viren oder aus Amplifikationsreaktionen, wie PCR (Polymerase Chain Reaction), SSSR (Self-Sustained-Sequence Replication), Ligase-Chain-Reaction und ähnlichen Reaktionen stammen, oder ob es sich um markierte Nukleinsäuren, wie in Biotin markierte, fluoreszenz-markierte oder radioaktiv markierte Nukleinsäuren handelt. Als Nukleinsäure kommen Nukleinsäuren in einem Größenbereich vom 10 Nukleotiden bis 200.000 Nukleotiden in Betracht. Als Nukleinsäuren im Sinne der Erfindung werden Olegonukleotide von 10 bis 100 Nukleotiden, RNA mit 50 bis 25.000 Nukleotiden, Plasmid-DNA mit 2.500 bis 25.000 Basenpaaren, Cosmid-DNA mit 5.000 bis 60.000 Basenpaaren oder genomische DNA mit 100 bis 200.000 Basenpaaren verstanden.

Die nach Schritt d) des erfindungsgemäßen Verfahrens erhaltene Nukleinsäurefraktion oder -fraktionen werden in Lösungen mit geringer Salzbelastung erhalten. Es ist somit möglich, die für die weitere Prozessierung erforderlichen Pufferbedingungen nachträglich einzustellen. In besonders vorteilhafter Weise wird die an dem Silicaglas gebundene Nukleinsäure bereits in dem zur Weiterverarbeitung bestimmten Puffer eluiert.

Die isolierten Nukleinsäuren werden für die unterschiedlichsten Anwendungen eingesetzt. Besonders häufig erfolgt die enzymatische Umsetzung mit Restriktionsenzymen, Polymerasen und Ligasen zur Restriktionsanalyse, Sequenzierung, Markierung mit Radioaktivität oder nicht radioaktiven Markern, wie Biotin, FITC, Digoxigenin und der Amplifikation mit Hilfe der PCR, SSSR (Self-Sustained-Sequence Replication) und Ligase-Chain-Reaction.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere für die Isolierung und Präparation von Plasmid-DNA und genomischer DNA geeignet.

Die Figuren zeigen bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei die verschiedenen Adsorptionsmaterialien für die Nukleinsäuren in einer Vorrichtung vereint sind.

Die Figur 1 zeigt eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, die aus einem Hohlkörper 1 mit einer Einlaßöffnung 7 und einer Auslaßöffnung 8 besteht. Der Hohlkörper besteht vorzugsweise aus Polypropylen (PP), Polyethylen (PE), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polytetrafluorethylen (PTEE), Polyethylterephthalat (PET) oder Polyacrylnitril (PAN). Im Hohlkörper 1 ist zwischen zwei Fixiereinrichtungen 5, 6 ein pulverförmiges erstes Material aus einem mineralischen Trägermaterial 10 ange-

ordnet. Im Hohlkörper 1 befindet sich ein zweites pulverförmiges Material 11 aus einem mineralischen Trägermaterial zwischen dem ersten Material 10 und der Auslaßöffnung 8. Die ersten und zweiten Materialien 10, 11 weisen unterschiedliche Adsorptionscharakteristika für Nukleinsäuren auf. Die Unterschiede in den Adsorptionscharakteristika werden durch unterschiedliches Adsorptionsverhalten in Puffern hoher bzw. niedriger Ionenstärken bestimmt. Werden zum Beispiel Nukleinsäuren vom ersten Material 10 unter Bedingungen niedriger Ionenstärke gebunden, so muß das zweite Material 11 in der Lage sein, Nukleinsäuren unter Pufferbedingungen niedriger Ionenstärke ungehindert passieren zu lassen, wohingegen unter Bedingungen hoher Ionenstärke die Nukleinsäure vom ersten Material 10 desorbiert und an dem zweiten Material 11 adsorbiert wird.

Vorzugsweise besteht das erste pulverförmige Material 10 aus einem Anionenaustauscher aus oberflächenmodifizierten Trägermaterialien auf Basis von Agarose, Dextranen, Cellulose, Acrylamid, Polyvinylalkohol, Polystyrol, Glas, Aluminiumoxid, Titanoxid, Zirkondioxid oder Silicagel, insbesondere Anionenaustauscher der oben genannten Art auf Silicagelbasis. Der vorzugsweise basische Ionenaustauscher weist eine Partikelgröße von 1 bis 250  $\mu\text{m}$ , bevorzugt von 10 bis 40  $\mu\text{m}$ , insbesondere 15 bis 25  $\mu\text{m}$ , und einem Porendurchmesser von 1 bis 2.500 nm, vorzugsweise 10 bis 500 nm, insbesondere 200 - 400 nm, auf.

Das zweite Material 11 ist ein mineralisches Trägermaterial, insbesondere aus Silicagel, Glas, Zeolith, Aluminiumoxid, Titandioxid, Zirkondioxid, Kaolin, Kieselalgen, vorzugsweise ein Silicaglas, gegebenenfalls in Form einer Silicagelsuspension. Das zweite Material 11 weist vorzugsweise eine Partikelgröße von 1 - 250  $\mu\text{m}$ , insbesondere 1 bis 30  $\mu\text{m}$ , bevorzugt 1 bis 5  $\mu\text{m}$ , auf.

Die Einrichtungen 5 und 6 bestehen vorzugsweise aus gesintertem Glas (Fritten) oder Membranen aus Kunststoff, wie Polyethylen, PTFE, Polypropylen, Glas, Keramik, Nylon oder ein Vlies aus Polypropylen, Polyethylen, Nylon. Die Porosität der Einrichtungen 5, 6 beträgt vorzugsweise 10 bis 500  $\mu\text{m}$ .

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung zeigt die Figur 2. Dort ist das erste Material 10 und das zweite Material 11 so im Hohlkörper 1 angeordnet, daß die Materialien 10, 11 direkt aneinandergrenzen und zwar in getrennten Schichten, die gemeinsam von den Fixiereinrichtungen 5, 6 gehalten werden. Vorzugsweise kann das Material durch eine Trenneinrichtung 13 getrennt werden, wobei die Trenneinrichtung 13 eine poröse Scheibe, vorzugsweise aus gesintertem Glas, oder eine Kunststoffmembran, oder Gewebe, vorzugsweise aus Nylon, ist.

Die Figur 3 zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei das zweite Material 11 in dem einen Kanal bildenden Auslaß 18 zwischen den Fixiereinrichtungen 5, 15 fixiert ist. Die einen Kanal bildende Auslaßöffnung 18 weist einen geringeren Querschnitt als der Hohlkörper 1 auf und mündet vorzugsweise in einem Kanal 18a, dessen Querschnitt geringer als derjenige des Kanals 18 ist. Das erste Material 10 befindet sich im Lumen des Hohlkörpers 1 im Bereich des größeren Durchmessers und ist durch die Einrichtung 6, 16 fixiert. Es kann dabei vorteilhaft sein, das erste und zweite Material 10, 11 aneinandergrenzen zu lassen, so daß diese nur durch eine gemeinsame Einrichtung 17 getrennt sind (siehe Figur 4).

Die Figur 5 beschreibt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die im Hohl-



körper neben den Schichten aus einem ersten und zweiten Material 10, 11 eine weitere Schicht 12 aufweist, die über dem ersten Material 10 angeordnet ist. Die Schicht 12 ist als mechanische Filtereinrichtung ausgebildet. Vorzugsweise ist die dritte Schicht 12 ein asymmetrischer Filter, wobei die Porengrößen des Filters in Fließrichtung der Probe, also von Zuführungsöffnung 7 zur Auslaßöffnung 8 bzw. 18, abnimmt. Damit können auch noch in der Probe befindliche Zelltrümmer entfernt werden, ohne daß die Gefahr einer Verstopfung der Vorrichtung besteht.

Die Materialien 10 und 11 können in sämtlichen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Vorrichtung entweder pulverförmig und/oder als Presskörper ausgebildet sein. Wenn die Materialien 10, 11 in Partikelform vorliegen, kann es empfehlenswert sein, diese in einem Trägernetz aus inerten Kunststoffen einzubetten, so daß die Schichten in Form einer Membran vorliegen gemäß US-PS 4,810,381 und US-PS 4,699,717 sowie in der DE 41 27 276 vorgeschlagen. Das Trägernetz kann aus Teflon bestehen.

Die Figur 6 beschreibt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung, wobei acht einzelne, getrennte Vorrichtungen gemäß Figur 2 aneinandergrenzen und eine Achtereinheit bilden. Der Vorteil dieser Ausführungsform, die mit jeder der in 1 - 5 beschriebenen Einzelformen durchführbar ist, liegt in der parallelen Präparation von 8 Proben unter Zuhilfenahme von Mehrkanalpipetten. Diese Form kann auch 12 mal aneinandergesetzt hergestellt werden, wobei 96 Proben prozessierbar werden. Der große Vorteil ist dann gegeben, wenn das international standardisierte Mikrotiter-Format verwendet wird.

Die Figur 7 beschreibt eine Vorrichtung, die in einem zylindrischen Hohlkörper 1 mit Einlaßöffnung 7 und Aus-

laßöffnung 8 ein Anionenaustauschermaterial 10 zwischen zwei Einrichtungen 6 und 5 fixiert enthält. Darauf ist aufgesteckt ein weiterer zylindrischer Hohlkörper in dessen Lumen verschiedene Filterschichten angeordnet sind. Die Filterschichten 20, 21, 22 können aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, PTFE, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteten Diatomenerde, z. B. Cellit oder Silicagel bestehen. Aber auch verwebtes, verklebtes Vlies in Form von Polypropylen, Polyester, Glasfasern und Silica kommen in Betracht. Die Porosität der einzelnen Schichten beträgt vorzugsweise 15  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$  in einer Dicke von 0,1 mm bis 10 mm. Die Porengröße der Filterschicht wird, in Fließrichtung gesehen, von Schicht zu Schicht geringer. In einer typischen Ausführungsform beträgt die Größe der Poren in der Schicht 20 etwa 100 bis 300  $\mu\text{m}$ , in der Schicht 21 30 bis 100  $\mu\text{m}$  und in der dritten Filterschicht 5 bis 30  $\mu\text{m}$ .

Die Figur 8 zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Vorrichtung nach Figur 7, wobei als, in Fließrichtung gesehen, oberste Filterschicht 23 eine hydrophobe Schicht eingesetzt wird. Die hydrophobe Trennschicht 23 verhindert die unerwünschte Penetration des rohen Zell-Lysats in die Filterschicht vor Beginn der eigentlichen Filtration. Die hydrophobe Trennschicht 23 besteht vorzugsweise aus versponnenem oder gesintertem Polypropylen, Polyethylen, Polyester oder Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Fasern, in einer Porosität von 10  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$  und vorzugsweise eine Dicke von 0,1 bis 5 mm.

Die Figur 9 beschreibt eine Filtrationsvorrichtung, die ähnlich aufgebaut ist, wie die in den Figuren 7 und 8 beschriebenen, mit dem Unterschied, daß verschiedene Filterschichten mit abnehmender Porengröße in einer einzigen Filterschicht 12 mit kontinuierlich abnehmender

Porengröße verbunden sind. Die asymmetrische Filterschicht 12 ist vorzugsweise mit einer hydrophoben Filterschicht 23 am oberen Ende, in Fließrichtung gesehen, versehen. Die asymmetrische Filterschicht 12 besteht vorzugsweise aus versponnenem Polypropylen oder Polyesterfasern; kommerziell erhältlich sind Profile, beispielsweise von Pall Filtertechnik, Dreieich, Frankfurt, mit Porositätsabstufungen von 500 bis 50  $\mu\text{m}$ , 100 bis 10  $\mu\text{m}$ , 50 bis 5  $\mu\text{m}$  sowie 10 bis 0,1  $\mu\text{m}$ . Die Dicke der asymmetrischen Filterschicht sollte vorzugsweise 1 mm bis 10 mm betragen.

Die Figur 10 beschreibt Filtrationseinrichtungen zur Abtrennung von Nukleinsäuren im erfindungsgemäßen Sinne wobei auf die Filterkonfigurationen der Figur 9 zurückgegriffen wird und wobei eine asymmetrische Filterschicht mit einer hydrophoben Filterschicht 23 versehen ist. Im Hohlkörper 1 befindet sich anstelle des Anionenaustauschers 10 ein mineralischer Träger 11, der in der Lage ist, Nukleinsäuren in hochkonzentrierten Salzlösungen zu adsorbieren.

Die Figur 11 beschreibt eine Konfiguration in einer Verbindung der Figuren 9 und 10. Dabei wird der Vorrichtung, die in Figur 2 beschrieben wird, lediglich ein Filteraufsatz bestehend aus einem asymmetrischen Filter 12 und einer hydrophoben Filterschicht 23 zugeordnet etwa durch Einstecken einer entsprechend ausgebildeten Kartusche.

Sämtliche Einzelvorrichtungen, die in den Figuren 1 bis 5 und 7 bis 11 näher beschrieben worden sind, lassen sich in einem Mikrotiterstreifen bestehend aus 8 aneinandergesetzten Einzelvorrichtungen anordnen. Beispielhaft ist dies noch einmal in den Figuren 12 bis 14 dargestellt.

Die Figur 12 zeigt eine Filtrationsvorrichtung mit Anionenaustauscher wobei ein Mikrotiterstrip oder eine

- 18 -

Mikrotiterplatte mit 8 bzw. 8 x 12 Vertiefungen. In der Vorrichtung gemäß Abbildung 12 befindet sich eine asymmetrische Filtrationseinrichtung in einer aufsteckbaren Kartusche auf dem zylindrischen Hohlkörper 1, der eine Anionenaustauscherschicht zwischen den Einrichtungen 5, 6 fixiert enthält.

Die Figur 13 betrifft eine Filtrationsvorrichtung, die anstelle des Anionenaustauschermaterials ein mineralisches Trägermaterial besitzt, welches in der Lage ist, Nukleinsäuren in hohen Salzkonzentrationen zu adsorbieren. Vorzugsweise befindet sich eine Silicagelschicht 11 angeordnet zwischen zwei Einrichtungen 5 und 6.

Die Figur 14 zeigt eine Kombination der Anordnung gemäß Figur 2 sowie einer asymmetrischen Filterschicht mit hydrophober Filterschicht, die über dem Hohlkörper 1, in Fließrichtung der Probe gesehen, angeordnet ist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, insbesondere die in Figur 3 oder 4 näher erläuterte Vorrichtungen, sind besonders vorteilhaft, das die Elution der Nukleinsäure aus dem zweiten Material 11 mit nur sehr geringen Flüssigkeitsmengen gewährleistet.

Der Durchfluß der Probe durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird grundsätzlich durch die Schwerkraft bewirkt, jedoch kann zur Beschleunigung der Reinigung und Trennung der Nukleinsäuren ein Überdruck an der Öffnung 7 bzw. ein Unterdruck an der Öffnung 8 bzw. 18 angelegt werden. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendet als asymmetrische Filter solche aus gesintertem Glas mit abnehmender Porengröße oder übereinandergeschichtete Kunststoffmembranen mit abnehmender Porengröße in Fließrichtung der Probe durch den Hohlkörper.

Nukleinsäuren aus Zellen und anderen Quellen können ohne Zentrifugation, Phenol/Chloroform-Extraktion und ohne Alkoholfällung erhalten werden, wobei die Nukleinsäure am Ende des Verfahrens in konzentrierter Form in Wasser oder Puffer niedriger Salzkonzentration vorliegt und somit direkt für anschließende enzymatische Reaktionen einsetzbar ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß der Einsatz von teuren Laboreinrichtungen vermieden werden kann. Die Elution kann beispielsweise durch Schwerkraft bewirkt werden und muß nicht mittels sogenannter HPLC-Geräte durchgeführt werden.

Die Herstellung einer Silicagel-Anionenaustauscher/-Silicagel-Extraktions-Säule erfolgt vorzugsweise dadurch, daß ein Polypropylen-Gefäß passend in ein handelsübliches 1,5 ml Zentrifugengefäß, unten mit einer 50 µm Polyethylen-Fritte (poröse Filterschicht aus Polyethylen, 1,5 mm dick) verschlossen wird und mit 50 mg Silicagel (Lichrosphere Si 100, 16 - 24 µm; Merck, Darmstadt, FRG) überschichtet. Diese Silicagelschicht wird mit einer zweiten porösen Polyethylen-Fritte verschlossen und die zweite Fritte mit 100 mg Silicagel-Anionenaustauscher (Qiagen, Fa. Diagen, Düsseldorf, FRG), Partikelgröße 16 bis 23 µm überschichtet und abschließend mit einer dritten porösen Polyethylen-Fritte verschlossen.

Die Herstellung einer Agarose-Anionenaustauscher/Silicagel-Extraktions-Säule erfolgt vorzugsweise dadurch, daß ein Polypropylen-Gefäß unten mit einer 50 µm Polyethylen-Fritte (poröse Filterschicht aus PE; 1,5 mm dick) verschlossen und mit 50 mg Silicagel (Lichrosphere Si 100, 16 - 24 µm) überschichtet wird. Diese Silicagelschicht wird mit einer zweiten Polyethylen-Fritte verschlossen und die zweite Fritte mit 0,5 ml DEAE-Sepharose FF (Fa. Pharmacia, Freiburg, FRG), Partikelgröße 45 - 165 µm überschichtet und abschließend mit einer dritten porösen Polyethylen-Fritte verschlossen.

- 20 -

Die Herstellung einer Anionenaustauscher-Membrane/Silicagel-Membran-Extraktions-Säule nach Figur 3 erfolgt vorzugsweise dadurch, daß in ein Polypropylen-Gefäß auf eine Polyethylen-Fritte eine 1 mm dicke Empore<sup>R</sup> Silicagelmembrane (3) (3M Corp. St. Paul, MN, USA), ein 0,2 mm dickes Polypropylen-Vlies und 1 mm dicke Anionenaustauscher-Membrane bestehen aus 16 - 23  $\mu\text{m}$  Qiagen Anionenaustauscher Partikel (Diagen GmbH, Düsseldorf, FRG) plaziert wird.

Die Herstellung einer Anionenaustauscher/Silicagel-Mikrotiterstreifen-Extraktions-Säule erfolgt wie beschrieben: Ein Mikrotiterstreifen mit 8 oder 96 Positionen wird mit einer DEAE.Silicagel-Membrane und einer Silicagel-Membrane gefüllt. In eine Bohrung eines Mikrotiterstreifens werden eine 0,75 mm dicke Silicagelmembrane, hergestellt aus Sident 9 Silicagelpartikeln (fa. Degussa, Frankfurt, FRG), eine 0,2 mm dicke Polypropylen-Vlies-Schicht und eine 0,8 mm dicke Anionenaustauscher-Membrane hergestellt aus Qiagen, 16 - 23  $\mu\text{m}$  (Fa. Diagen, Düsseldorf, FRG) eingepaßt.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele weiter erläutert.

#### Beispiel 1

##### Präparation von Plasmid DNA

Eine 100 ml Kultur in LB-Ampicillin Medium mit pUC 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5.000g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml 50 ml Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100  $\mu\text{g/ml}$  RNase A resuspendiert.

Um die Zelle zu lysieren werden 10 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt

und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird mit 10 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure neutralisiert, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird 30 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgehoben. 1 ml klares Zell-Lysat wird auf eine DEAE-Anionenaustauscher/Silicagel-Zentrifugations-Extraktions-Säule pipettiert und die Probe durch die Austauscherschicht 1 Minute bei 2.500 g zentrifugiert. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub> gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Spuren an ETOH werden eventuell durch eine weitere Zentrifugation entfernt. Anschließend wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 durch Zentrifugieren eluiert und in neuen 1,5 ml Rörchen aufgefangen. Die eluierte DNA kann dann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

## Beispiel 2

### Parallele Präparation von Plasmid DNA

8 DEAE-Silicagel-Membrane/Silicagel-Extraktions-Säulen werden auf einer Vakuumkammer aufgesetzt. 8 x je 1 ml eines Plasmid DNA enthaltenden Zell-Lysates werden unter Vakuum (20 bis 750 mbar) durch die Extraktionssäulen gesaugt. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub> gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>,

- 22 -

15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht eluiert und dabei direkt an die Silica-gel-Schicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die Probenröhrchen werden zur Entfernung der hochkonzentrierten Salzlösung mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 und 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionsschicht vorhandenen Ethanol-H<sub>2</sub>O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert.

### Beispiel 3

#### Präparation von M13 Einzelstrang DNA

1 ml M13 Phagensuspension werden mit 0,5 ml 30% PEG 6000, 1,5 M NaCl versetzt und nach 10 Minuten Inkubation auf Eis 15 Minuten bei 15.000 g abzentrifugiert. Das Phagenpellet wird in 0,5 ml 0,5 M Guanidin-HCl, 1% Triton X-100 resuspendiert und 10 Minuten bei 70°C lysiert. Das Phagenlysat wird auf einer Vakuumkammer direkt durch eine Extraktionssäule nach Beispiel 3 gesaugt und adsorbiert. Die Extraktionssäule wird mit 1 ml 0,75 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0, 1ml 0,75 M NaClO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 gewaschen und mit 7 M Guanidin, 15% Ethanol, 50 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscherschicht eluiert und an die SiO<sub>2</sub>-Schicht adsorbiert.

### Beispiel 4

#### Präparation von genomischer DNA aus Blut

1 ml citrat-stabilisiertes, humanes Vollblut werden zur



Lyse der Erythrozyten mit 1 ml 1% Saponin versetzt und sofort nach dem Mischen, 5 Minuten bei 2.500 g abzentrifugiert. Die Leukozyten werden in 1 ml PBS-Buffer resuspendiert und nochmals pelletiert. Die gewaschenen Leukozyten werden in 1 ml 500 mM Guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 0,1 ml Proteinase K (10 mg/ml) 2 Stunden bei 50°C lysiert. Das Leukozyten-Lysat wird sofort auf die Agarose/Anionenaustauscher/Silicagel/Extraktionssäule pipettiert und mit 1 ml 0,25 M NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und 1 ml 0,25 M NaClO<sub>4</sub>, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen. 1 ml citrat-stabilisiertes, humanes Vollblut wird unter Vakuum, durch eine Anionenaustauscher-Silicagel-Säule gesaugt. Die Leukozyten werden dabei in der Matrix eingefangen, wogegen die wesentlich kleineren Erythrozyten durch die Matrix durchwandern. Die Extraktionssäule wird zweimal mit 1 ml PBS-Puffer nachgewaschen. Die eingefangenen Leukozyten werden mit 10 % Tween 10, 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Zellbruchstücke und Proteine werden mit zweimal 1 ml 1 M Guanidin-HCl, pH 7,0 ausgewaschen und die DNA mit 7M NaClO<sub>4</sub>, 50mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Säule eluiert.

#### Beispiel 5

Präparation, Entsalzung und Konzentration von DNA im Mikrotiterformat

96 x 1 ml Kulturen von Plasmid pBluescript in XL 1 Blue E.coli Zellen, werden im 2 x YT Medium 18 Stunden bei 37°C in einer Mikrotiterplatte mit 1,5 ml Vertiefungen (Fa. Beckmann, München) kultiviert. Die Zellen werden in einer Mikrotiterzentrifuge für 10 Minuten bei 2.500 g pelletiert. Mit einer 8-Kanal Multichannel-Pipette (Fa. Matrix Technologies, Lowell, MA, USA) werden je 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA in die

Mikrotiterplattenvertiefungen pipettiert und die Zellen 5 Minuten auf einen Vibrations-Schüttler resuspendiert.

Die Zellen werden durch die Zugabe von je 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS 5 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln lysiert. Anschließend werden je 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure, pH 5,5 - 6,0 Neutralisationspuffer zugegeben, die einzelnen Näpfe mit einer Kappe verschlossen und gemischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wird die Probe 30 Minuten bei 3.000 g zentrifugiert, um die Zellbruchstücke und das präzipitierte SDS zu pelletieren. Der Überstand wird mit einer 8-Kanal-Multichannel-Pipette vorsichtig abgehoben und in die 96er Mikrotiterplatte mit einer DEAE-Silicagelmembrane und Silicagelmembrane pipettiert. Nach der Überführung aller 96 Proben werden die Proben durch Anlegen eines Vakuums an eine Filtrierapparatur durch die Mikrotiterplatte gesaugt. Die DNA wird dabei an die Anionenaustauscher-Schicht adsorbiert, wohingegen unter diesen speziellen Bedingungen Proteine, RNA und Metabolite nicht adsorbiert werden.

Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub> gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,0 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Anschließend wird die von Salz befreite DNA in konzentrierter Form mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 von der Silicagel-Schicht in eine weitere Mikrotiterplatte eluiert.

Die Herstellung der Zell-Lysate mit Hilfe der Zentrifugation ist ein langwieriges und aufwendiges Verfahren. Die Limitierung ist vor allem dann gegeben, wenn viele Proben routinemäßig präpariert werden müssen. Die Zentrifugation hat den Nachteil, daß sie sich nicht automatisieren läßt.

Ein weiterer Gegenstand (und Verfahren) der Erfindung ist eine Vorrichtung und ein Verfahren zur automatischen Durchführung des Verfahrens ohne Zentrifugation in Form einer Filtrationseinheit, die der eigentlichen Reinigung der Nukleinsäure vorgeschaltet ist.

Dabei wird die Probe nach bekannter Weise mit Proteinasen, Detergentien und/oder Temperatur oder Alkali lysiert. Dieses rohe Lysat wird direkt auf den Filtrationsaufsatz dekantiert, überführt oder pipettiert. Die Filterschicht des Filtrationsaufsatzes ist so aufgebaut, daß ein Verstopfen der Filter durch die Zelltrümmer, ausgefallene Proteine oder Detergentien vermieden wird. Das Zell-Lysat wird durch die Filterschicht mit einem Stempel oder Überdruck durchgedrückt oder unter Anlegen eines Vakuums durchgesaugt. Dabei werden alle ungelösten Bestandteile zurückgehalten und das klare Lysat tropft direkt auf die Adsorptionsschicht. Durch die Wahl der geeigneten Adsorptionsbedingungen wird die Nukleinsäure an der Adsorptionsschicht adsorbiert. Die Filtrationseinheit mit dem Filterkuchen wird von der Adsorptionseinheit abgetrennt und/oder verworfen und für die Analyse des Filterkuchens aufgehoben. Die Adsorptionseinheit wird mit geeigneten Lösungsmitteln oder Puffern nachgewaschen, um unerwünschte Bestandteile zu entfernen und die erwünschte Probe wird zum Schluß mit einem geeigneten Elutionsmittel eluiert.

Beispielsweise läßt sich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Plasmid DNA ohne eine Klar-Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge präparieren. 96 x 1 ml Kulturen von Plasmid pBluescript in XL1 Blue E.coli Zellen, werden im 2 x YT Medium 18 Stunden bei 37 °C in einer Mikrotiterplatte mit 1,5 ml Vertiefungen (Fa. Beckmann, München) kultiviert. Die Zellen werden in einer Mikrotiterzentrifuge für 10 Minuten bei 2.500 g pelletiert.

Mit einer 8-Kanal Multichannel-Pipette (Fa. Matrix Technologies, Lowell, MA, USA) werden je 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A in die Mikrotitervertiefungen pipettiert und die Zellen 5 Minuten auf einem Vibrations-Schüttler resuspendiert. Die resuspendierten Zellen werden in das Probenreservoir des Filtrationsaufsatzes überführt und mit 0,25 ml 0,2 M NaOH/1% SDS versetzt. Die Probe wird 5 Minuten auf einen Vibrations-schüttler geschüttet oder mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen und gemischt, oder durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur zur Lyse wird zur Neutralisation der NaOH und Präzipitation des SDS 0,25 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure zugegeben und nach einem der oben beschriebenen Verfahren gemischt. Dieses rohe Zell-Lysat wird nun statt einer Zentrifugation auf einer Vakuumkammer bei 10 mbar - 800 mbar Vakuum durch die Filtrationsschicht gesaugt. Eine asymmetrische oder eine stufenweise Porosität im Bereich 200 µm bis 5 µm aufweisende Filterschicht mit einer Dicke von 2 - 10 mm hält die Zellbruchstücke und anderen ungelösten bzw. präzipitierten Bestandteile zurück ohne zu verstopfen. Das Plasmid DNA enthaltende, klare Zell-Lysat tropft durch die Filterschicht auf die Adsorptionsschicht (Anionenaustauscher oder Silicagel) und die DNA wird adsorbiert, wogegen Proteine, RNA und andere zelluläre

- 27 -

Metabolite unter den gegebenen Salzbedingungen nicht binden. Die Filtration ist nach ca 10 bis 60 Sekunden beendet. Der Filteraufsatz wird abgenommen und zusammen mit dem Filterkuchen verworfen.

Die gebundene DNA wird mit 1 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl pH 7,0 und 2 mal mit 1 ml 1,5 M NaClO<sub>4</sub>, 10 mM Na-Acetat, pH 6,5 gewaschen und mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 von Anionenaustauscher eluiert und nach Passieren der Trennschicht aus einem Nylonnetz oder PP-Vlies unter den hohen Salzkonzentrationen sofort an die Silicagelschicht gebunden. Dabei binden die Proteine und RNA bei 1 M - 2 M NaClO<sub>4</sub> nicht an die Silicagelschicht und werden ausgewaschen. Die Silicagelschicht wird zum Entfernen der restlichen Spuren an Proteinen mit 1 ml 7 M Guanidin HCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 gewaschen. Die Hochsalzlösung an 7 M NaClO<sub>4</sub> wird zweckmäßigerweise mit 1 ml 70% EtOH, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 und 1 ml 90% Ethanol/Wasser oder 1 ml 90% Aceton/Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen wird die Plasmid DNA salzfrei und inkonzentrierter Form mit 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,5 eluiert.

Auf diese Weise läßt sich die Plasmid DNA in kürzester Zeit ohne Zentrifugation, Phenol/Chloroform-Extraktion und ohne Alkoholfällung mit einer Ausbeute von 50% bis 80% inkonzentrierter Form isolieren. Bei der Verwendung einer beschriebenen Mikrotiterplattenversion lassen sich 96 Plasmid-Minipreps von 1 - 2 ml E.coli Kulturen mit einer Ausbeute von 1 - 10 µm DNA in ca. 60 Minuten präparieren von einer Person. Die bisher bekannten Verfahren benötigen dazu 6 bis 12 Stunden.

#### Beispiel 6

Plasmid Miniprep mit einer Vorrichtung nach Figur 7

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 7 überführt. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbrucstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen.

Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsalzung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkohol-Pellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

#### Beispiel 7

Präparation von Plasmid DNA mit einer Vorrichtung nach Figur 8

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml

RNAse A resuspendiert und in die Filtrationsvorrichtung überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 8 gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrations-schichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 1 ml 1,25 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Die eluierte DNA wird zur Entsaltung und zur Konzentrierung mit Alkohol gefällt und das Alkohol-Pellet durch eine Zentrifugation pelletiert.

#### Beispiel 8

Präparation von Plasmid DNA an einer Silicagel-Schicht mit einer Vorrichtung nach Figur 10

Eine 1,5 ml XL Blue E.coli Kultur mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium wird 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Zell-Pellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNAse A resuspendiert und in die Filtrationsvorrichtung nach Figur 10 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvor-

richtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,5 ml 5,5 M Guanidin-HCl, 0,25 M K-Acetat, pH 5,5 zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung nach Abb. 10 wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit einem Kolbenstempel oder Überdruck durch die Filtrationsschicht abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 1 ml 7 M NaClO<sub>4</sub>, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 gewaschen und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen und die Ethanolspuren durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

#### Beispiel 9

Präparation von 8 x Plasmid DNA in einem Mikrotiterstreifen

8 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Vorrichtung nach Figur 14 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder



- 31 -

einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung esaugt. Alternativ kann die Probe mit Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht 10 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht 11 gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionsschicht vorhandenen Ethanol-H<sub>2</sub>O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert.

#### Beispiel 10

Präparation von 8 x 1 ml M13 DNA mit einer Vorrichtung nach Figur 13

8 x 1 ml M13 Phagensuspension werden mit 0,5 ml 30% PEG 6000, 1,5 M NaCl versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben werden auf eine Vorrichtung nach Abb. 13 überführt und das Phagenlysat wird auf einer Vakuumkammer direkt durch eine Vorrichtung nach Figur 13

- 32 -

gesaugt und filtriert. Das Phagenpellet wird durch das Durchsaugen von 7M Guanidin-HCl, pH 7,0 lysiert und die DNA gleichzeitig an die Silicagelschicht 11 adsorbiert. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 1 ml 7 M Guanidin-HCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktionssäule wird mit 0,0 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen und für 1 - 2 Minuten Luft durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

#### Beispiel 11

Präparation von 8 x 12 Plasmid DNA mit einer Vorrichtung nach Figur 14

96 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar - 800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Überdruck durch die Filtrationsschichten ge-

drückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht 10 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht 11 gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen.

Die in der Extraktionsschicht vorhandenen Ethanol-H<sub>2</sub>O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1 - 2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 96 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion, wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

#### Beispiel 12

##### Präparation von Plasmid-DNA ohne Konditionierung

Eine 3 ml Kultur in LB-Ampicillin-Medium mit pUC 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird 15 Minuten bei 10.000 g zentri-

fugiert und der Überstand vorsichtig abgehoben. Das klare Zell-Lysat wird auf eine DEAE-Anionenaustauscher-Extraktionssäule pipettiert und die Probe durch die Austauscherschicht durchgesaugt. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 0,7 ml 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 auf eine Extraktionssäule mit einer Glasfasermembran gesaugt. Die eluierte DNA-Lösung in 7 M NaClO<sub>4</sub> wird durch die Glasfasermembran gesaugt und dabei direkt an die Silicagelschicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/ Wasser gewaschen. Spuren an EtOH werden eventuell durch ein Durchsaugen von Raumluft entfernt. Zum Schluß wird die DNA mit 10 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen.

### Beispiel 13

#### Präparation von Plasmid-DNA mit Konditionierung

Eine 3 ml Kultur in LB-Ampicillin-Medium mit pUC 18 transformierten HB 101 E. coli Zellen wird 10 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 1,2 M NaOH, 1% SDS werden zur Zellsuspension gegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wird 15 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgehoben. Das klare Zell-Lysat wird auf eine DEAE-Anionenaustauscher-Extraktionssäule pipettiert und die Probe durch die Aus-

- 35 -

tauscherschicht durchgesaugt. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen und mit 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 5,0 konditioniert. Die DNA wird mit 0,7 ml 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 auf eine Extraktionssäule mit einer Glasfasermembran gesaugt. Diese Glasfasermembran wurde vorher mit 0,2 ml 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 konditioniert, um eine bessere Adsorption der DNA zu erreichen und Verluste in den ersten Tropfen zu vermeiden. Die eluierte DNA-Lösung in 7M NaClO<sub>4</sub> wird anschließend auf einer Vakuumvorrichtung durch die Glasfasermembran gesaugt und dabei direkt an die Silicagelschicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/ Wasser gewaschen. Spuren an EtOH werden eventuell durch ein Durchsaugen von Raumluft entfernt. Zum Schluß wird die DNA mit 100 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDT, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen.

Die Vorkonditionierung kann auch durch eine mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 getränkte und getrocknete Membran erreicht werden. Durch die Vorkonditionierung werden die Adsorptionsverluste von 30 % auf unter 5% reduziert und die Gesamtausbeute der DNA erhöht sich von 50 - 60% auf 80 - 90%.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren, insbesondere Plasmid- oder genomischer DNA, aus Zellen oder anderen Quellen, wobei
  - a) die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer entfernt werden oder sonstige nukleinsäurehaltige Proben mit Anionenaustauschern behandelt werden, und zwar in Pufferlösungen mit geringer Ionenstärke,
  - b) danach die Nukleinsäuren mit einem Puffer hoher Ionenstärke von dem Anionenaustauscher desorbiert werden, um danach
  - c) im Puffer hoher Ionenstärke oder in Gegenwart von niederen Alkoholen, und/oder Polyethylenglykol mit einem mineralischen Trägermaterial behandelt zu werden unter Adsorption der Nukleinsäure an die Oberfläche der mineralischen Trägerstoffe, woraufhin
  - d) eine Désorption der Nukleinsäure mit Wasser oder einer Pufferlösung mit geringer Ionenstärke erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verfahrensschritte b) und c) unmittelbar aufeinanderfolgend durchgeführt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei Zentrifugations- oder Filtrationsschritte dem Schritt a) vorgeschaltet werden, um nicht gelöste Bestandteile mechanisch abzutrennen.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei zwischen den Schritten a) und b) ein oder mehrere Waschschriffe mit Pufferlösungen mit geringer oder pro Waschschriff steigender Ionenstärke erfolgen.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei zwischen den Schritten c) und d) ein oder mehrere Waschschriffe mit einer Pufferlösung hoher Ionenstärke erfolgen.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei zwischen den Schritten c) und d) mindestens ein Waschschriff mit wäßrig/alkoholischer Lösung erfolgt.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei zwischen den Schritten c) und d) des Anspruchs 1 ein Waschschriff mit etwas höherer Ionenstärke entsprechend einer 1,5 molaren Natriumperchlorat-Lösung und relativ niedrigem pH-Wert, wie etwa 5, durchgeführt wird.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei ein Anionenaustauscher vorzugsweise mit hoher Oberflächenladung verwendet wird.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Nukleinsäure aus einer PCR- (Polymerase Chain Reaction), SSSR- (Self-Sustained- Sequence Replication), Ligase-Chain-Reaction stammt.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Nukleinsäure 10 Nukleotide bis 200.000 Nukleotide umfaßt.

11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Nukleinsäuren aus Bakterien, Zellkulturen, Blut, Gewebe, Urin, Viren oder anderen biologischen Quellen stammt.
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei markierte Nukleinsäuren insbesondere mit Biotin markierte Nukleinsäuren fluoreszenz markierte Nukleinsäuren, wie mit Fluorescein-Isothiocyanat markierte oder radioaktiv markierte Nukleinsäuren eingesetzt werden.
13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei als mineralische Träger Silicagel, Glas, Zeolithe, Aluminiumoxid, Titandioxid, Zirkonoxid, Kaolin und/oder Kieselalgen verwendet werden.
14. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei poröse oder nicht poröse Matrices verwendet werden mit einer Partikelgröße von 1  $\mu\text{m}$  bis 250  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 10 bis 30  $\mu\text{m}$ .
15. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei eine Silicagelsuspension mit einer Partikelgröße von 1 bis 250  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 1 bis 5  $\mu\text{m}$  verwendet wird.
16. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei der Anionenaustauscher eine Partikelgröße von 1 bis 250  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 10 bis 100  $\mu\text{m}$ , und einem Porendurchmesser von 1 bis 2.500 nm, vorzugsweise 100 bis 400 nm, aufweist.
17. Vorrichtung zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren mit einem Hohlkörper (1) mit einer Einlaßöffnung (7) und einer Auslaßöffnung (8), wobei



im Hohlkörper (1) zwischen zwei Fixiereinrichtungen (5, 6) ein pulverförmiges erstes Material auf Silicagelbasis (10) angeordnet ist, dadurch gekennzeichnet, daß ein zweites Material (11) zwischen dem ersten Material (10) und der Auslaßöffnung (8) angeordnet ist, wobei die ersten und zweiten Materialien (10, 11) unterschiedliche Adsorptionscharakteristika für Nukleinsäuren aufweisen.

18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Fixiereinrichtungen (5, 6) poröse Scheiben aus gesintertem Glas oder Keramik (Fritten) oder Membranen aus Kunststoffen, wie Polyethylen, Polypropylen, Polytetrafluorethylen oder Nylon, sind.
19. Vorrichtung nach Anspruch 17 und/oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Materialien (10, 11) direkt aneinandergrenzen, und zwar in getrennten Schichten, und gemeinsam von den Fixiereinrichtungen (5, 6) gehalten werden.
20. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Materialien (10, 11) durch eine Trenneinrichtung (13) getrennt sind.
21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Trenneinrichtung (13) eine poröse Scheibe, vorzugsweise aus gesintertem Glas (Fritte), oder eine Kunststoffmembran, vorzugsweise aus Nylon, ist.
22. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Material (11) in dem einen Kanal bildenden Auslaß-

röhrchen (18), das einen geringeren Querschnitt als der Hohlkörper (1) aufweist, zwischen den Fixiereinrichtungen (5, 15) fixiert ist.

23. Vorrichtung nach Anspruch 22, wobei das zweite Material (11) vom ersten Material (10) nur durch eine gemeinsame Einrichtung (17) getrennt sind.
24. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß das erste Material (10) aus einem Anionenaustauscher auf Silicagelbasis besteht, während das zweite Material (11) aus einem Silicaglas besteht.
25. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Materialien (10, 11) pulverförmig und/oder Preßkörper sind.
26. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 17 bis 24, wobei die Partikel der Materialien (10, 11) in einem Trägernetz aus inerten Kunststoffen eingebettet sind.
27. Vorrichtung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Trägernetz aus Teflon besteht.
28. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß im Hohlkörper (1) eine weitere Schicht (12) zwischen dem Einlaß (7) und dem ersten Material (10) angeordnet ist, die als mechanische Filtereinrichtung wirkt.
29. Vorrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die dritte Schicht (12) ein asymmetrischer Filter ist, wobei die Porengrößen des Filters in Fließrichtung abnimmt.

30. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 28 und/oder 29, wobei der asymmetrische Filter aus gesintertem Glas mit abnehmender Porengröße oder übereinandergeschichteten Kunststoffmembranen mit abnehmender Porengröße besteht.
31. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 30 in einem Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Proteinentfernung einer nukleinsäurehaltigen Probe unter Vermeidung einer phenolischen, phenolisch/Chloroform oder Chloroform-extraktion.
32. Verwendung eines Wasch- oder Adsorptionspuffers zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung 1 bis 7 M Natriumperchlorat, 1 bis 7 M Guanidinhydrochlorid, 1 bis 5 M Natriumchlorid, 1 bis 6 M Natriumiodid, 1 M Natriumchlorid/20% Ethanol oder niedere Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Butanol und/oder Polyethylenglykol enthält.
33. Verwendung eines Puffersystems zur Elution der adsorbierten Nukleinsäuren in einem Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei der Puffer Wasser, Tris bei einem pH-Wert von 5 bis 9 enthält.
34. Verwendung der gemäß einem der Verfahren 1 bis 16 gewonnenen Nukleinsäuren in einer der folgenden enzymatischen Reaktionen, wie Restriktionsabtauung, Sequenzierung, Amplifikation, Markierung.
35. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei

- 42 -

- a) die Zelltrümmer oder sonstige Partikel durch eine Filterschicht mit, in Fließrichtung der Probe gesehen, abnehmender Porengröße entfernt werden,
  - b) wobei dann das Efluat mit einem Anionenaustauscher in Pufferlösungen mit geringer Ionenstärke behandelt wird.
36. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 35, wobei mindestens eine Filterschicht (12, 20, 21 oder 22) im Lumen eines im wesentlichen zylindrischen Hohlkörpers (1) vor einer zwischen zwei Einrichtungen (5, 6) fixierten Schicht (10) mit Anionenaustauschereigenschaften, aus der Richtung der Einlaßöffnung (7) her gesehen, angeordnet ist.
37. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei
- a) die Zelltrümmer oder sonstige Partikel durch eine Filterschicht mit, in Fließrichtung der Proben gesehenen, abnehmenden Filterporengrößen entfernt werden,
- wobei
- b) das Effluat danach mit einem mineralischen Träger in Pufferlösungen hoher Ionenstärke behandelt wird.
36. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 37, wobei mindestens eine Filterschicht (12, 20, 21 oder 22) im Lumen eines im wesentlichen zylindrischen Hohlkörpers (1) vor einer zwischen zwei Einrichtungen (5, 6) fixierten Schicht (11), die Nukleinsäuren bei hoher Ionenstärke der ent-

- 43 -

sprechenden Lösung zu binden vermag, aus der Richtung der Einlaßöffnung (7) her gesehen, angeordnet ist.

-1/10-

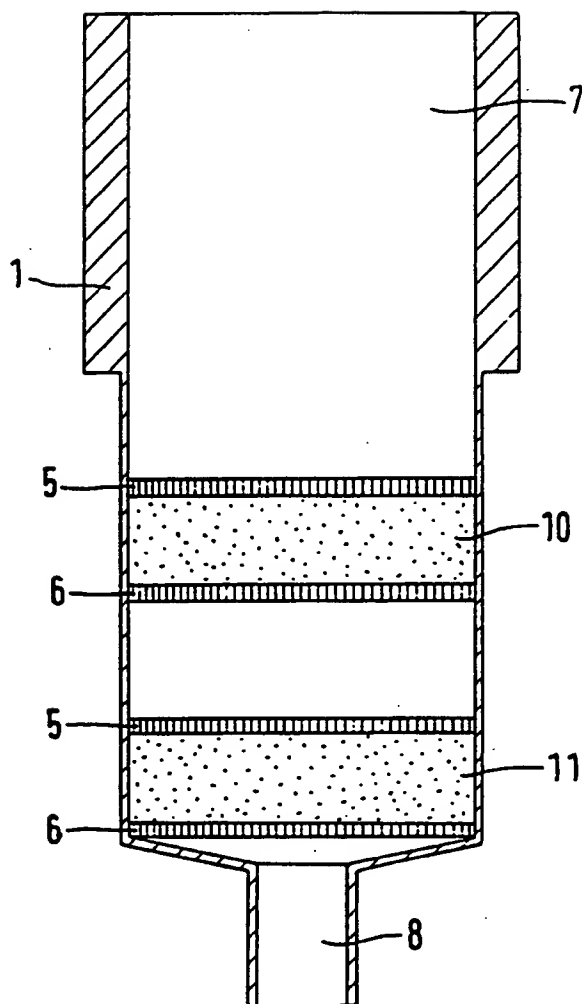


FIG. 1

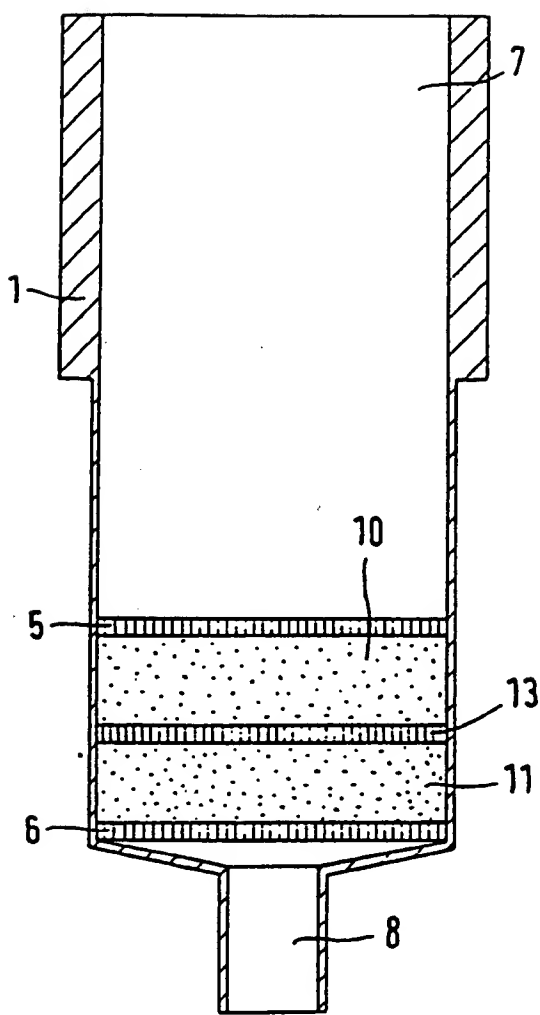


FIG. 2

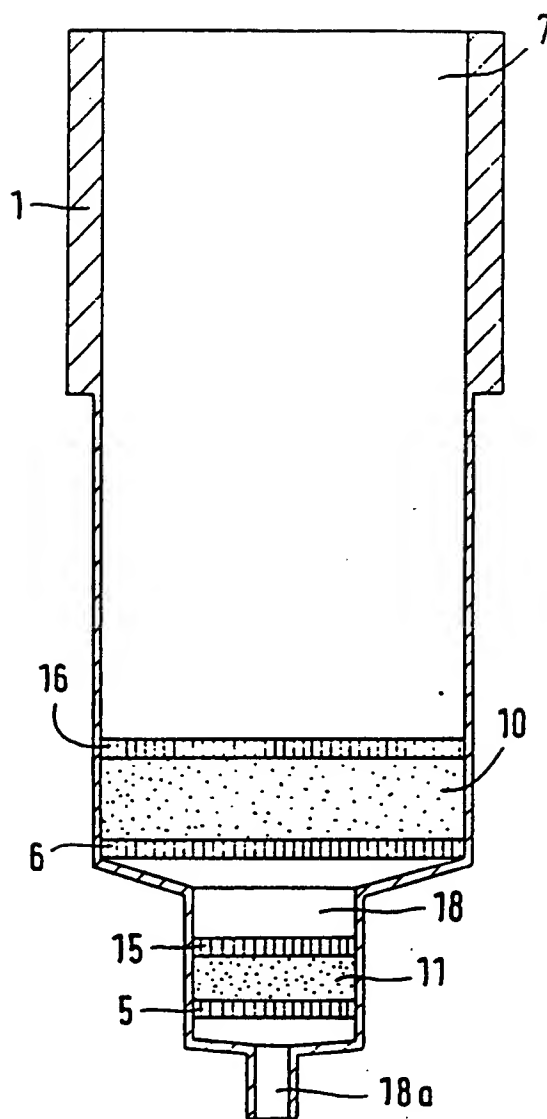


FIG. 3

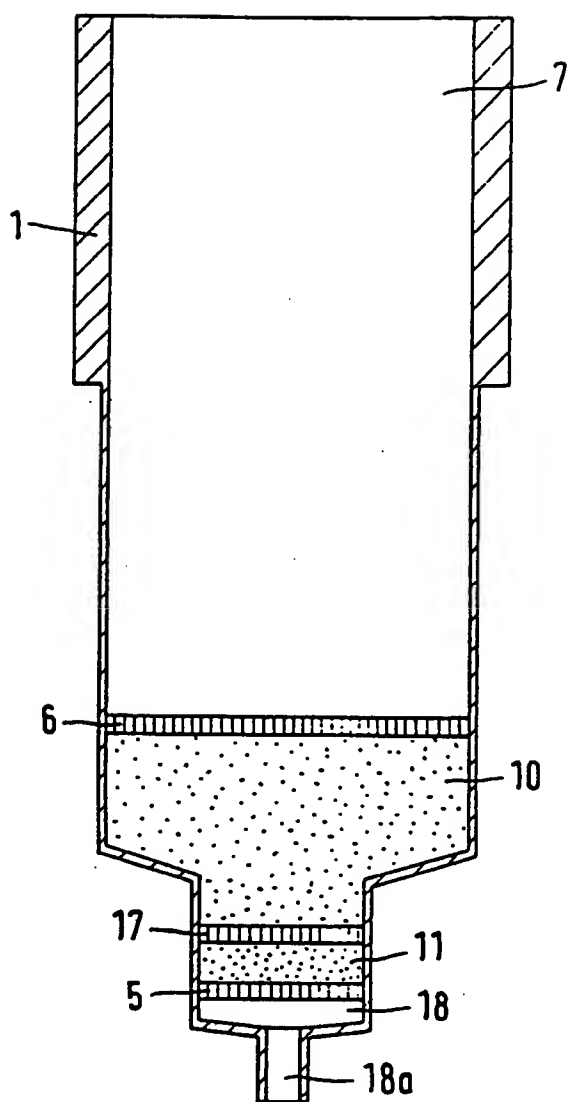


FIG. 4

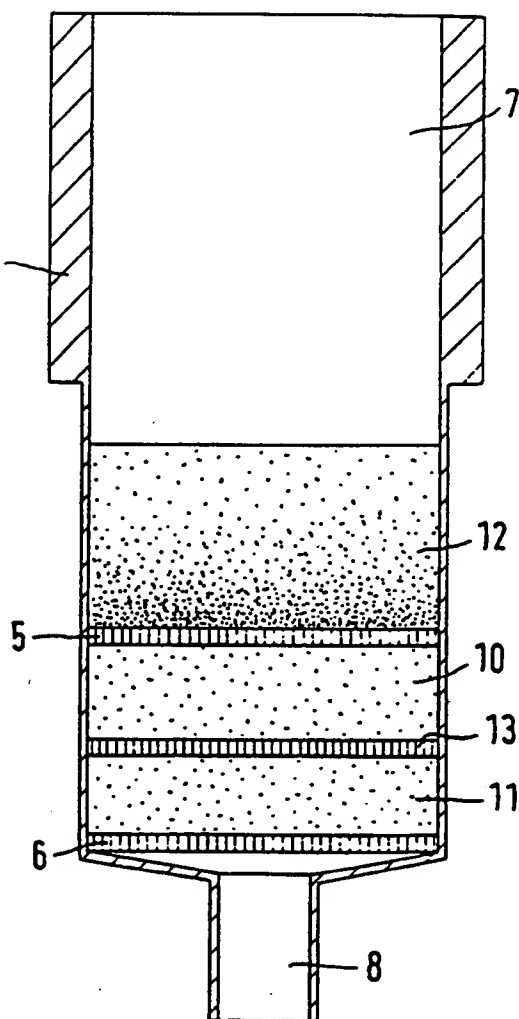


FIG. 5



- 4 / 10 -

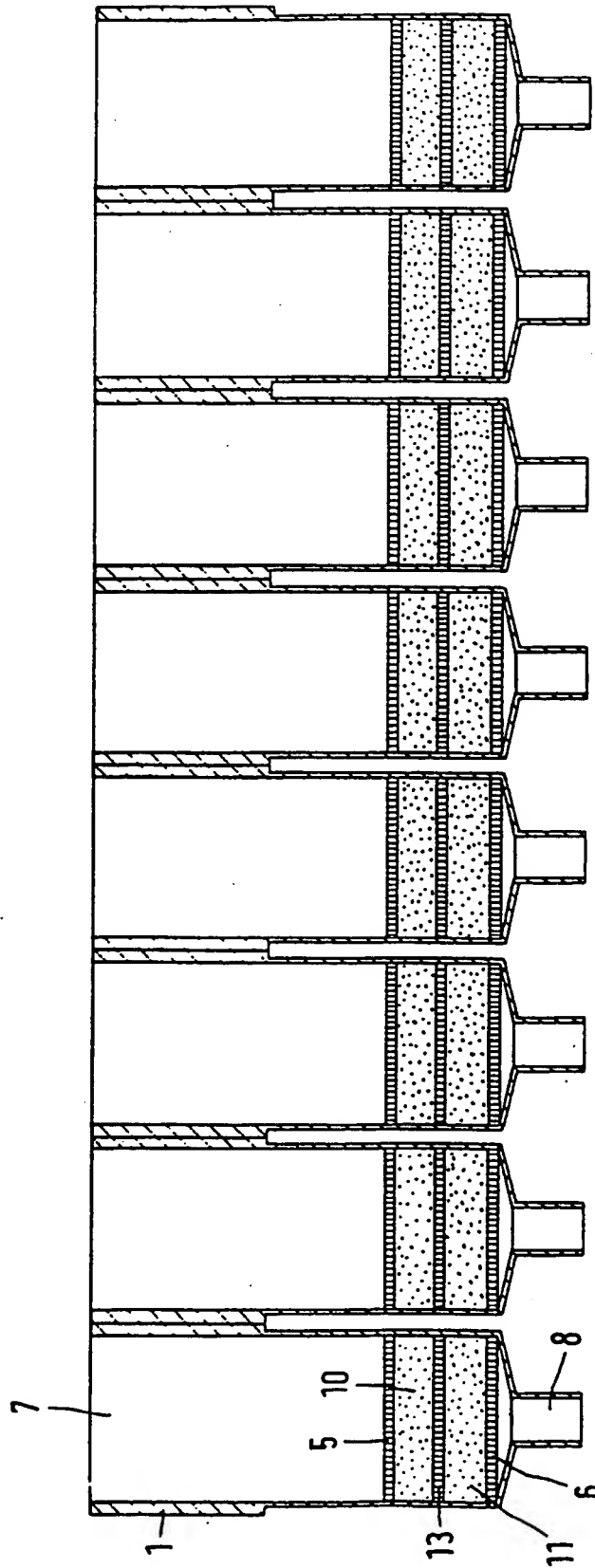


FIG. 6

- 5 / 10 -

FIG. 7

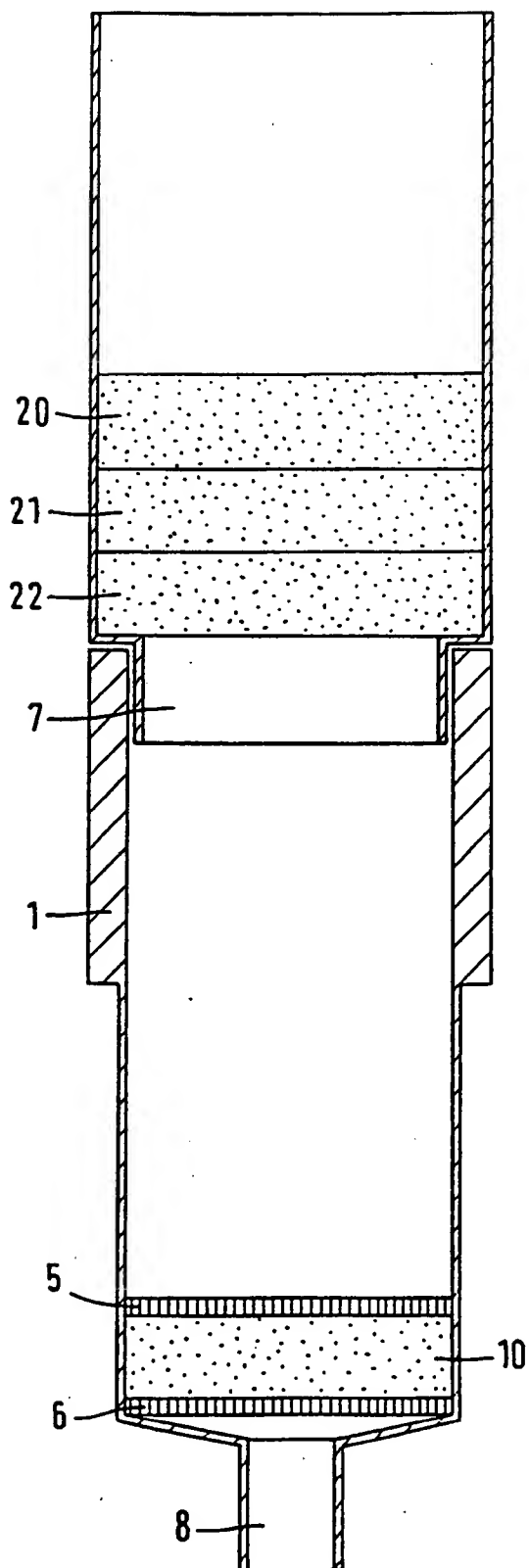


FIG.8

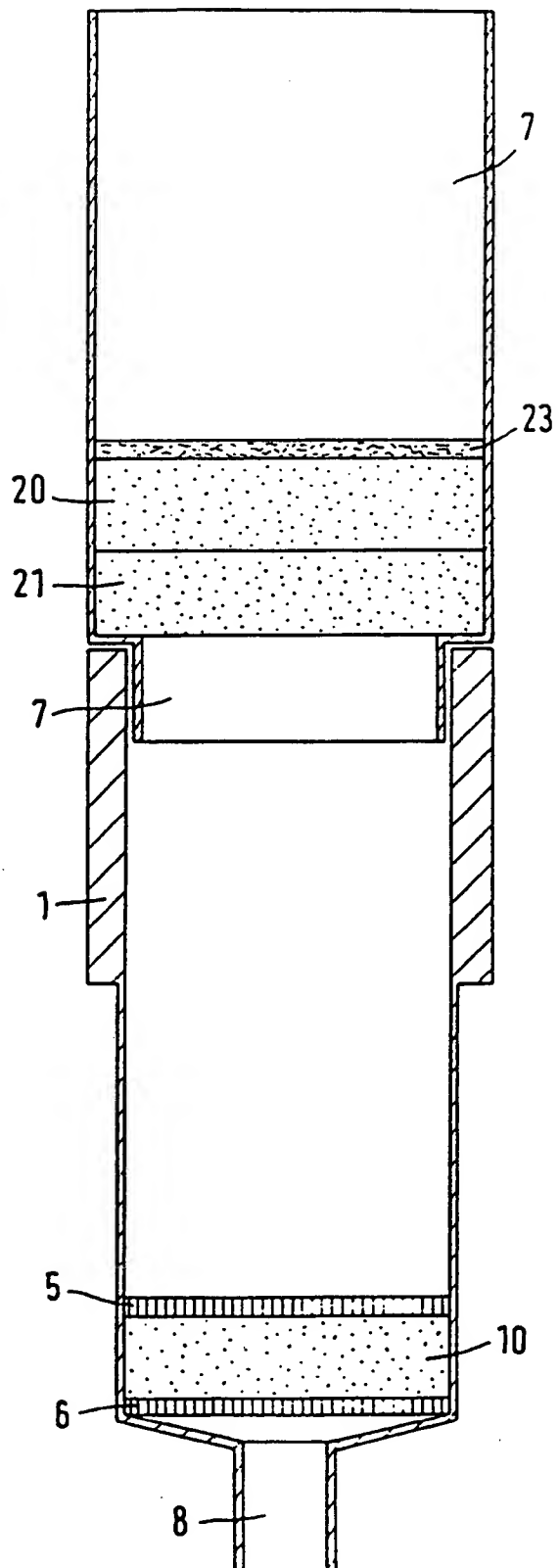


FIG. 9

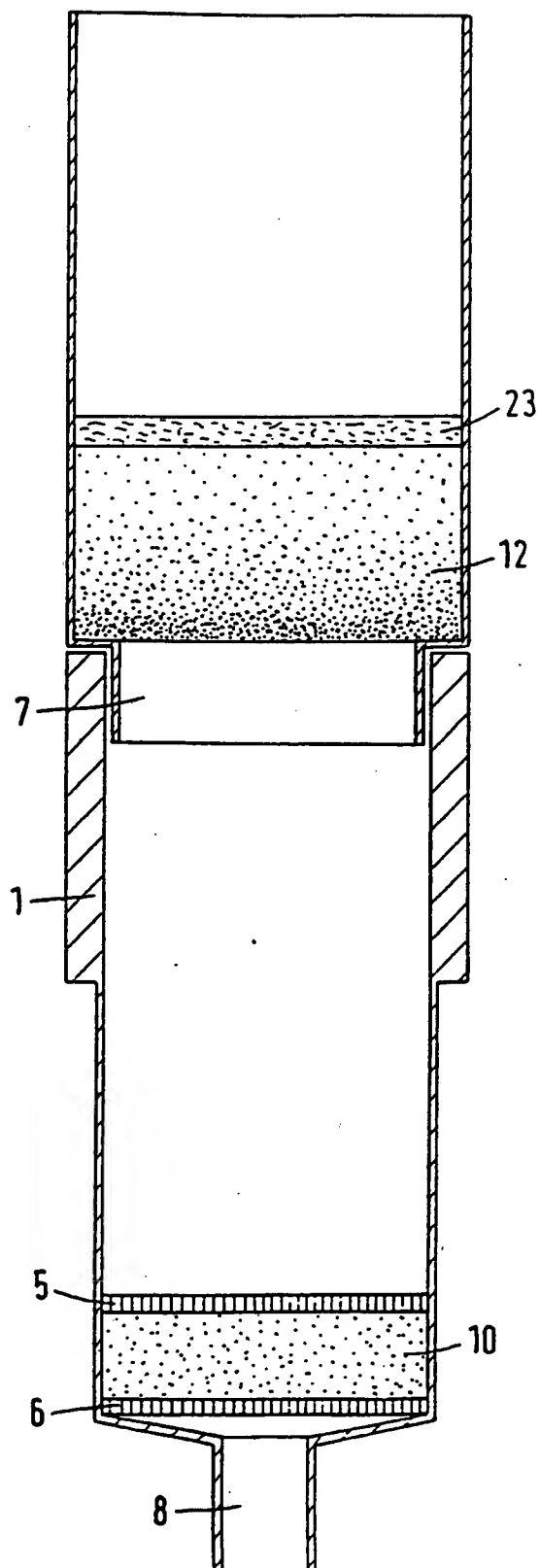


FIG. 10

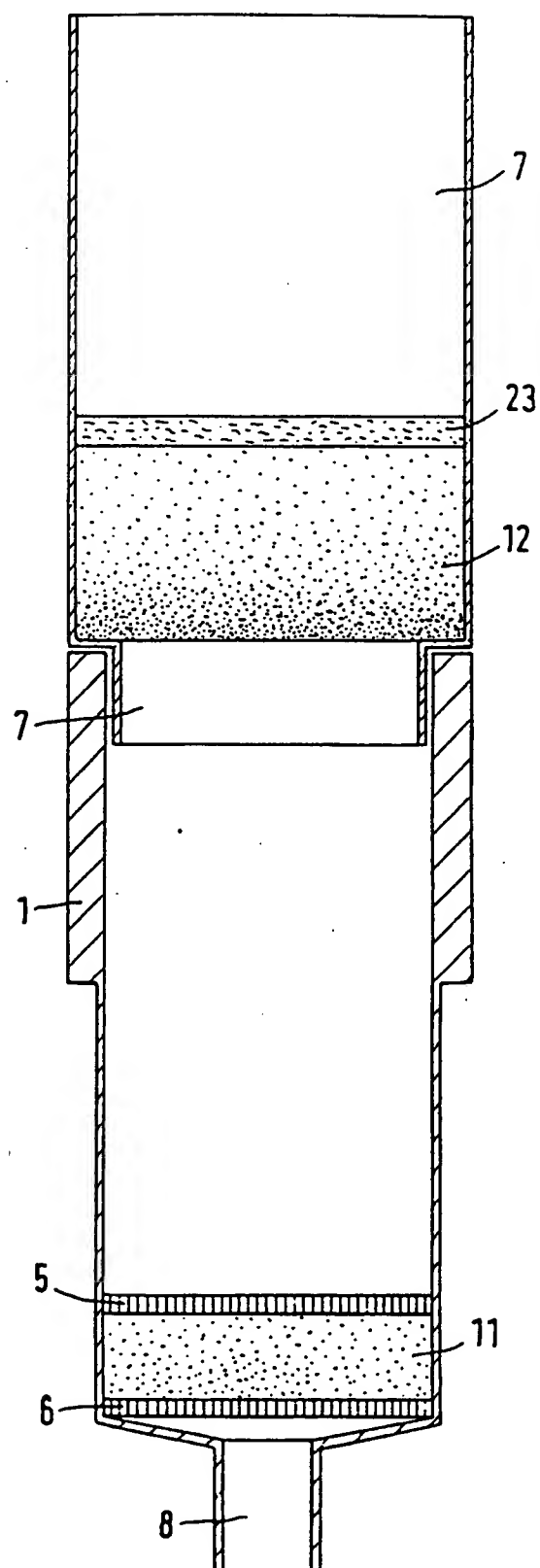
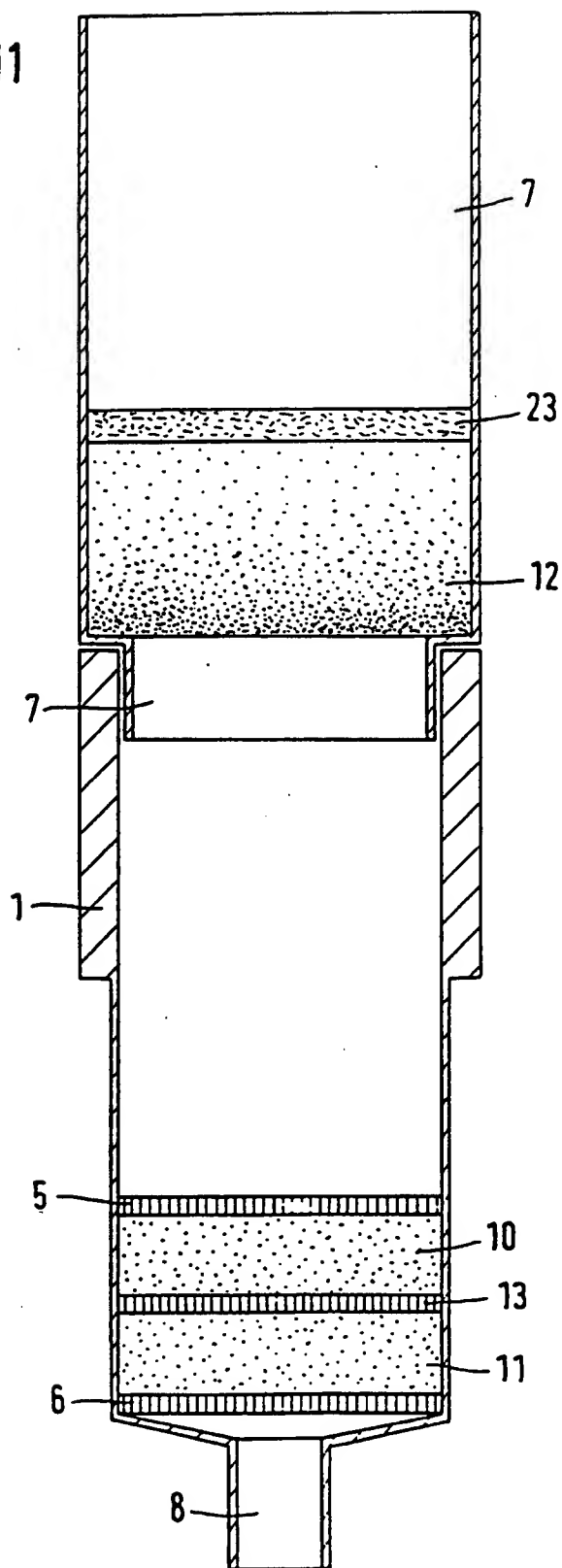


FIG.11



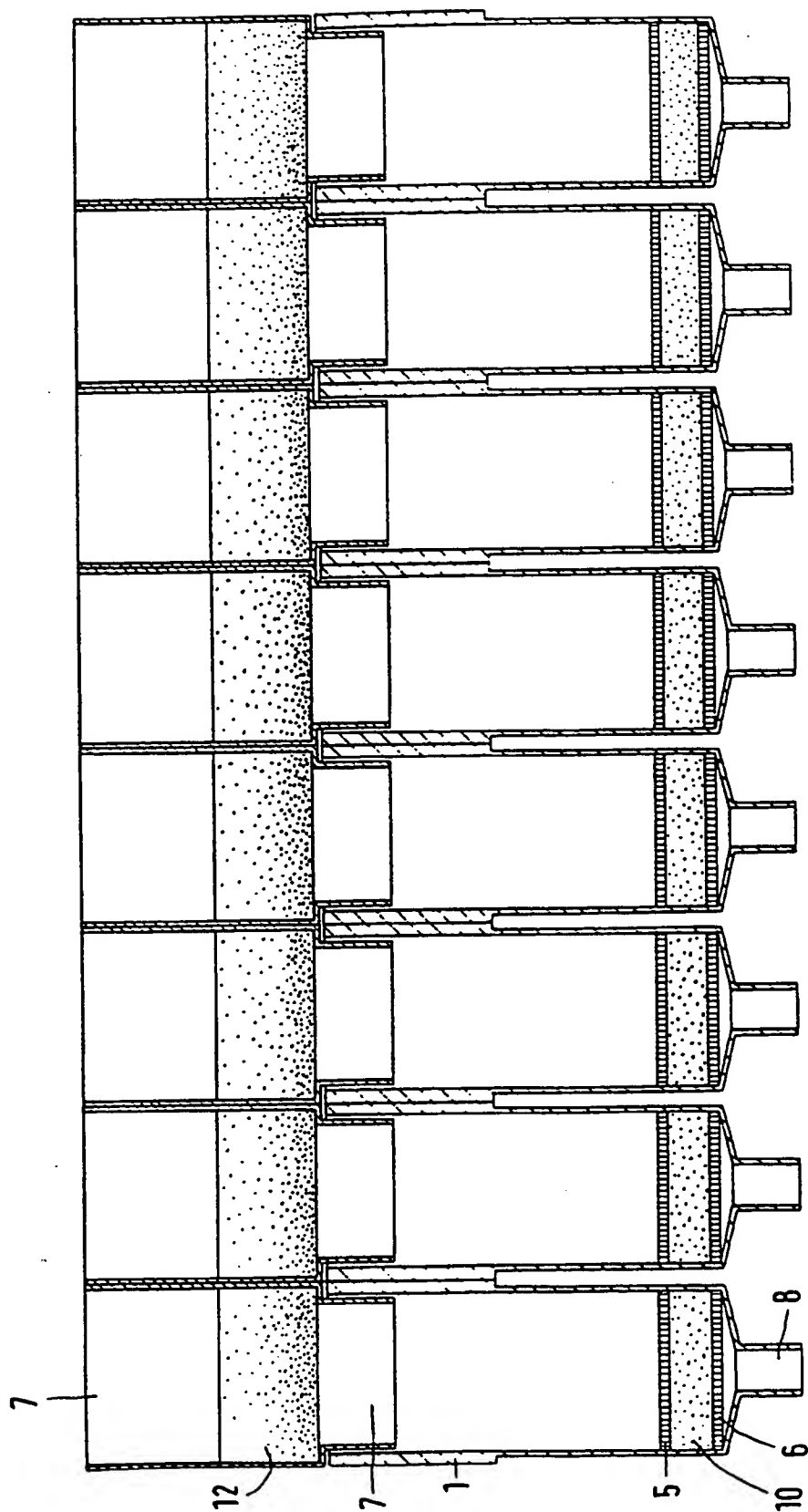


FIG.12

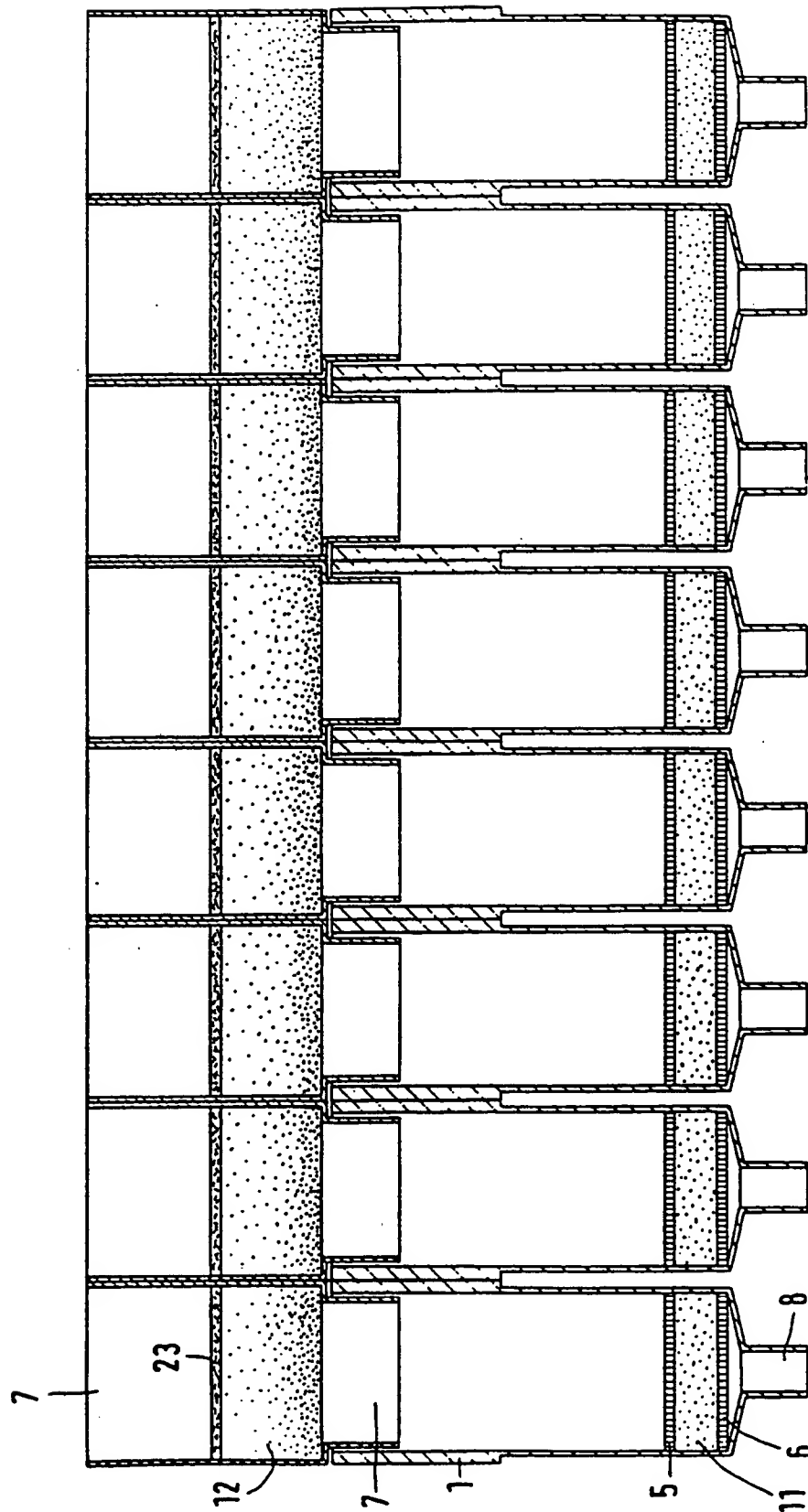


FIG.13

- 10/10 -

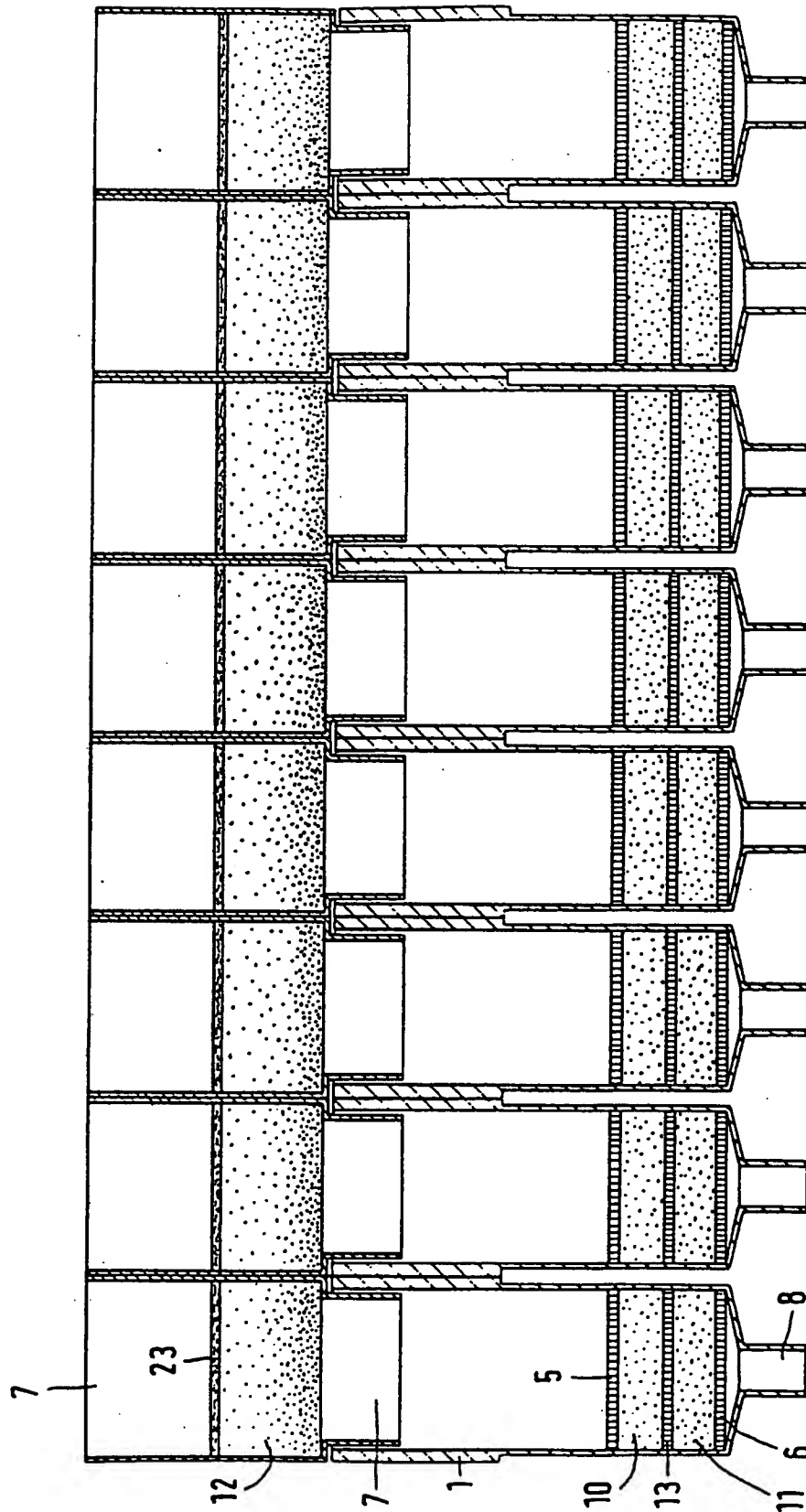


FIG.14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP92/02775

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>5</sup> : C12N 1/08; C12N 15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>5</sup> : C12N; C07K; C07H, B01J B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, A, 0 376 080 (TALENT SRL) 4 July 1990, see the whole document ---	1-25,28-37
Y	EP, A, 0 268 946 (DIAGEN INSTITUT FUR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 1 June 1988, see the whole document ---	1-25,28-37
P,Y	US, A, 5 075 430 (M.C. LITTLE) 24 December 1991, see column 8, lines 13-61 see column 11, lines 26-37; claims ---	1-16,31-34
Y	WO, A, 9 105 606 (MACHEREY-NAGEL & CO.) 2 May 1991, see abstract see page 5, paragraph 3 - page 7, paragraph 1; claims ---	1-16,31-34
A	WO, A, 9 107 422 (BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION) 30 May 1991, see page 6, line 29 - page 10, line 36; claims ---	1-16,31-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 February 1993 (26.02.93)

Date of mailing of the international search report

15 March 1993 (15.03.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP92/02775

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A, 4 810 381 (D.F. HAGEN ET AL.) 7 March 1989, see column 8, lines 13-61 see column 11, lines 26-37; claims ---	25-27
A	US, A, 4 935 142 (S. STERNBERG) 19 June 1990, see the whole document ---	17-30
A	EP, A, 0 389 063 (AKZO N.V.) 26 September 1990, -----	

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9202775  
SA 67175

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 26/02/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0376080	04-07-90	CA-A- 2006185	22-06-90
EP-A-0268946	01-06-88	DE-A- 3639949	09-06-88
		JP-A- 63150294	22-06-88
		US-A- 5057426	15-10-91
US-A-5075430	24-12-91	None	
WO-A-9105606	02-05-91	DE-A- 3935098	25-04-91
		EP-A- 0496822	05-08-92
WO-A-9107422	30-05-91	US-A- 4997932	05-03-91
		EP-A- 0508985	21-10-92
US-A-4810381	07-03-89	DE-A- 3873899	24-09-92
		EP-A, B 0323055	05-07-89
		JP-A- 1209363	23-08-89
		US-A- 4906378	06-03-90
		US-A- 4971736	20-11-90
US-A-4935142	19-06-90	None	
EP-A-0389063	26-09-90	NL-A- 8900725	16-10-90
		AU-A- 5215390	27-09-90
		CA-A- 2012777	23-09-90
		JP-A- 2289596	29-11-90

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12N1/08; C12N15/10		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierte Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12N ; C07K ; C07H ; B01J B01D	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>		
Art. <sup>9</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
Y	EP,A,0 376 080 (TALENT SRL) 4. Juli 1990 siehe das ganze Dokument ---	1-25, 28-37
Y	EP,A,0 268 946 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 1. Juni 1988 siehe das ganze Dokument ---	1-25, 28-37
P,Y	US,A,5 075 430 (M.C. LITTLE) 24. Dezember 1991 siehe Spalte 8, Zeile 13 - Zeile 61 siehe Spalte 11, Zeile 26 - Zeile 37; Ansprüche ---	1-16, 31-34
	-/--	
<p><sup>10</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
26.FEBRUAR 1993	15. 03 93	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
EUROPAISCHES PATENTAMT	BEVAN S.R.	

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,9 105 606 (MACHEREY-NAGEL & CO.) 2. Mai 1991 siehe Zusammenfassung siehe Seite 5, Absatz 3 - Seite 7, Absatz 1; Ansprüche ---	1-16, 31-34
A	WO,A,9 107 422 (BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION) 30. Mai 1991 siehe Seite 6, Zeile 29 - Seite 10, Zeile 36; Ansprüche ---	1-16, 31-37
A	US,A,4 810 381 (D.F. HAGEN ET AL.) 7. März 1989 siehe Spalte 8, Zeile 13 - Zeile 61 siehe Spalte 11, Zeile 26 - Zeile 37; Ansprüche ---	25-27
A	US,A,4 935 142 (S.STERNBERG) 19. Juni 1990 siehe das ganze Dokument ---	17-30
A	EP,A,0 389 063 (AKZO N.V.) 26. September 1990 -----	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9202775  
SA 67175

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

26/02/93

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0376080	04-07-90	CA-A- 2006185	22-06-90
EP-A-0268946	01-06-88	DE-A- 3639949	09-06-88
		JP-A- 63150294	22-06-88
		US-A- 5057426	15-10-91
US-A-5075430	24-12-91	Keine	
WO-A-9105606	02-05-91	DE-A- 3935098	25-04-91
		EP-A- 0496822	05-08-92
WO-A-9107422	30-05-91	US-A- 4997932	05-03-91
		EP-A- 0508985	21-10-92
US-A-4810381	07-03-89	DE-A- 3873899	24-09-92
		EP-A, B 0323055	05-07-89
		JP-A- 1209363	23-08-89
		US-A- 4906378	06-03-90
		US-A- 4971736	20-11-90
US-A-4935142	19-06-90	Keine	
EP-A-0389063	26-09-90	NL-A- 8900725	16-10-90
		AU-A- 5215390	27-09-90
		CA-A- 2012777	23-09-90
		JP-A- 2289596	29-11-90

EPO FORM P0073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82